

Aus der Klinik für Anaesthesiologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

**Micro-RNA 125a inhibiert Chemotaxis und endotheliale Adhäsion
humaner Monozyten in der Sepsis**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Stephanie Marie-Christina Larissa Hinske
aus Coesfeld

2019

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. rer. physiol. Simone Kreth

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Ries

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2019

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

“Micro-RNA 125a inhibiert Chemotaxis und endotheliale Adhäsion humaner Monozyten in der Sepsis” selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 04.04.2019

Stephanie Hinske

Meinen Eltern,

Annette und Ludwig Hinske

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1. Einleitung:	7
1.1. Die akute Entzündungsreaktion	7
1.2. Molekulare Mechanismen der Inflammation	9
1.3. Monozyten	10
1.4. Chemokine	12
1.4.1. Chemokinbiologie	12
1.4.2. Die Rolle von CC-Chemokinrezeptor 2 auf Monozyten in der Inflammation	13
1.5. Die Chemotaxis	15
1.6. Monozytenadhäsion	16
1.7. Resolution	18
1.8. microRNAs	19
1.8.1. Biogenese von microRNAs	20
1.8.2. Post-transkriptionelle Regulation von Zielgenen durch microRNAs	21
1.8.3. MicroRNAs in der Sepsis und im ARDS	22
2. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	24
3. Methoden	25
3.1. Zellbiologische Methoden	25
3.1.1. Kultivierung von Zellen	25
3.1.2. Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität	26
3.1.3. Gewinnung primärer humaner Monozyten	26
3.1.4. Immunomagnetische Monozyten-Separation	28
3.1.5. Stimulation der Monozyten	29
3.2. Molekularbiologische Methoden	29
3.2.1. DNA-Extraktion	29
3.2.2. RNA-Extraktion	30
3.2.2.1. RNA-Isolierung aus dem Vollblut von Sepsis-Patienten	31
3.2.3. cDNA-Synthese	31
3.2.4. Quantifizierung der mRNA-Expression mit UPL-Sonden	32
3.2.5. Quantifizierung der miR-125a-Expression	34
3.3. Klonierung der 3'UTR-Vektorkonstrukte von CCR2, JAM-A und JAM-L	35
3.3.1. Klonierung in den StrataClone PCR Cloning Vector	35
3.3.1.1. Amplifikation	35
3.3.1.2. Ligation in den Klonierungsvektor pSC-B-amp/kan	37
3.3.1.3. Hitzeschocktransformation in kompetente E.coli Zellen	39

3.3.1.4. Restriktionsverdau durch Endonukleasen	39
3.3.2. Klonierung der 3'UTR in den Expressionsvektor psiCHECKTM-2	40
3.3.2.1. Ligation	40
3.3.2.2. Gerichtete Mutagenese der miR-125a-Bindestellen	41
3.3.3. Plasmidpräparation und DNA-Sequenzierung	43
3.3.3.1. Minipräparation und Midipräparation	43
3.3.3.2. DNA-Sequenzanalyse	44
3.4. Transiente Transfektion	44
3.4.1. Transiente Transfektion primärer humaner Monozyten	44
3.4.2. Transiente Kotransfektion von HEK-293-Zellen	46
3.4.3. Dualer Luciferase-Reportergen-Assay	46
3.4.4. Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektionseffizienz	47
3.5. Proteinbiochemische Methoden	48
3.5.1. Gewinnung von Zytosol- und Membranprotein und Proteinbestimmung	48
3.5.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
3.5.3. Western Blot	50
3.6. Durchflusszytometrische Bestimmungen	51
3.7. Microarray	52
3.8. Chemotaktische Studien	53
3.8.1. Boyden-Kammer Migrationsassay	53
3.8.2. Chemotaxis3D-Assay mit Echtzeit-mikroskopischer Auswertung	54
3.9. Adhäsionsstudien	57
3.9.1. Isolierung von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)	57
3.9.2. μ -Slide I-Coating	58
3.9.3. Monozytenadhäsion unter Flussbedingungen	58
3.9.3.1. Aktivierung der Monozyten und Färbung mittels Calcein	58
3.9.3.2. Scherbeanspruchung mittels ibidi Fluidic Pumpensystem	59
3.9.4. Calceinassay	60
3.10. Statistische Auswertungen	60
4. Ergebnisse	61
4.1. In silico-Analyse und in vitro-Validierung identifizieren den CCR2 als potenzielles Zielgen der miR-125a auf humanen Monozyten	61
4.2. Der CCR2 wird über zwei Bindungsstellen in der 3'UTR direkt durch miR-125a reguliert	68
4.3. Die Interaktion von miR-125a und CCR2 reguliert das Migrationsverhalten von primären humanen Monozyten	70
4.4. Identifikation des funktionellen Netzwerks der miR-125a führt zur potenziellen Regulation von zwei junktionalen Adhäsionsmolekülen: JAM-A und JAM-L	74

4.5. Klonierung der 3'UTR in Reportervektoren bestätigt die direkte Regulation von JAM-A und JAM-L durch miR-125a	79
4.6. miR-125a reguliert die Adhäsion von Monozyten durch ihre Targets JAM-A, JAM-L und CCR2	80
4.7. Die miR-125a-Expression in humanen Monozyten wird durch das umgebende Milieu reguliert	85
4.8. LPS induziert die miR-125a-Expression und führt über die dadurch bedingte verminderte CCR2-Expression zur Ortsständigkeit von Monozyten	87
4.9. Die Regulation der miR-125a ist abhängig vom bakteriellen Serotypen des LPS	90
4.10. Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen führt zur Induktion der miR-125a	93
4.11. miR-125a wird in der Frühphase der Sepsis vermindert exprimiert und korreliert mit induzierten Zielgen-Expressionen	95
5. Diskussion	98
6. Zusammenfassung	113
7. Summary	115
8. Literaturverzeichnis	116
9. Material	125
9.1. Geräte	125
9.2. Reagenzien	128
9.3. Rezepturen (Medien, Puffer und Lösungen)	137
9.4. Gele	139
9.5. Verbrauchsmaterialien	140
9.6. Antikörper	141
9.6.1. Western Blot	141
9.6.2. Attune Durchflusszytometer-Analysen	142
9.6.3. Oligonukleotide	142
9.6.3.1. Klonierung	143
9.6.3.2. Mutagenese	143
9.6.3.3. qPCR	144
10. Danksagung	146
11. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	149
11.1. Abbildungsverzeichnis	149
11.2. Tabellenverzeichnis	151
12. Abkürzungsverzeichnis	153

1. Einleitung:

Die Rekrutierung von Monozyten ist ein grundlegendes Merkmal der Inflammation¹. Monozyten gehören zum mononukleären phagozytischen System und machen 3–8% der Leukozytenpopulation im Blut aus. Sie entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, wo sie sich auch ausdifferenzieren und dann in den Blutstrom gelangen^{2,3}. Während der Entzündungsphase (Inflammation) zeigen sie antimikrobielle Wirkung durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine und die Phagozytose eingedrungener Mikroorganismen und von Zelldebris. In der Resolutionsphase tragen sie u.a. durch die Produktion von Wnt-Liganden zur Wundheilung bei^{4,5}.

Auf das Eindringen von Mikroorganismen und Fremdkörpern reagiert der Körper mit der Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren wie Lipidmediatoren, Zytokinen und Chemokinen; Letztere führen zur Chemotaxis von Monozyten, die anschließend an das Endothel adhären, dieses überqueren und dann ins Gewebe an den Ort der Inflammation migrieren. Diese Funktionen, die maßgeblich vom Chemokinrezeptor CCR2 und seinem Liganden CCL2 vermittelt werden⁶, sind überlebenswichtig. Eine fehlende Monozytenrekrutierung führt zu erheblichen immunologischen Beeinträchtigungen, wohingegen eine exzessive Monozytenaktivierung die Resolution der Inflammation behindert⁷.

1.1. Die akute Entzündungsreaktion

Was Aulus Cornelius Celsus AD 40 mit *calor* (Wärme), *tumor* (Schwellung), *rubor* (Rötung) und *dolor* (Schmerz) beschrieb und was 1872 von Virchow durch die *function laesa* (Funktionsverlust) ergänzt wurde⁸, stellt sich heute als eine komplexe Kaskade aus Signaltransduktion und Systembiologie dar⁹.

Die Infektion mit einem Pathogen ruft im Organismus eine akute Inflammation hervor, die gezielt Zellen und Moleküle des Immunsystems rekrutiert. Mastzellen stellen dabei die „first responder“ dar, die durch die Ausschüttung verschiedener Mediatoren zu einer Vasodilatation führen und auch die Kapillarpermeabilität erhöhen. Dem Gradienten chemotaktischer Stoffe folgend werden zunächst polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) zum inflammatorischen Geschehen rekrutiert, die dann weitere chemotaktisch aktive Mediatoren freisetzen. Dieser Mechanismus katalysiert die Entzündungsreaktion und führt zur Rekrutierung weiterer Leukozyten¹⁰.

Die Sepsis und das akute Lungenversagen (oder Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)) stellen zwei Beispiele einer massiven Hyperinflammation des Organismus ohne Resolution dar. Die Sepsis ist eine lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer exzessiven Immunantwort des Wirtsorganismus auf eine Infektion¹¹. Diese wird vor allem durch Bakterien, Pilze, Viren oder verschiedene Parasiten hervorgerufen. Bei septischen Patienten mit positiver Blutkultur zeigte sich, dass in 64% der Fälle eine Infektion durch Gram-negative Bakterien der Auslöser der Sepsis war^{12,13}. Trotz großer Fortschritte in der Medizin ist die Sepsis bis heute lebensbedrohlich. In den Vereinigten Staaten zeigt sie eine Mortalitätsrate von 44 pro 100.000 Einwohnern und verursacht somit 9% aller Sterbefälle¹⁴. Mit einer Sepsis kann ein akutes Lungenversagen assoziiert sein, das in 40–60% der Fälle zum Tode führt. Das ARDS ist laut Definition ein schweres hypoxämisches Versagen der Lunge, das mit einer Beeinträchtigung des Gasaustausches zwischen den Alveolen, dem Interstitium und den Kapillaren einhergeht¹⁵.

Im Krankheitsgeschehen der Sepsis und des ARDS spielen Monozyten eine wichtige Rolle, sowohl in der Entstehung als auch im Verlauf. Durch eine exzessiv erhöhte Chemokinausschüttung durch CCL2 werden Monozyten CCR2-abhängig chemotaktisch rekrutiert und infiltrieren das Gewebe. Dieser Vorgang ist bei Entzündungen normal und

notwendig, solange er in seiner Intensität an den auslösenden Stimulus angepasst ist. Unkontrolliert führt er jedoch zu einer übermäßigen Inflammation und einer gestörten Resolution^{16–18}.

1.2. Molekulare Mechanismen der Inflammation

Im Rahmen einer Inflammation nehmen die vaskuläre Permeabilität und die Gewebeperfusion zu, was zu einer vermehrten Rekrutierung von PMN führt. Dieser Vorgang wird maßgeblich durch eine erhöhte Konzentration von Interleukin-8 (IL-8) im inflammatorischen Areal getriggert, die aus einer gesteigerten Zytokinausschüttung ortsständiger Gewebsmakrophagen und Endothelzellen resultiert. Die aktivierten PMN steigern die Expression von Integrinen und sezernieren neben Elastase auch CCL2 (*monocyte chemotactic protein*, MCP-1), das im späteren Verlauf auch von Endothel- und Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten und weiteren kernhaltigen Zellen ausgeschüttet wird¹⁹. Infolgedessen kommt es zu einer Veränderung des chemotaktischen Gradienten, was wiederum zu einer starken transendothelialen Migration von Monozyten ins Gewebe führt²⁰.

Die lokale Inflammation ist eine physiologische Antwort des Wirtsorganismus zum Schutz vor Gewebeschädigung und/oder Infektionen durch eindringende mikrobielle Pathogene¹². Um eine akute Inflammation zu initiieren, müssen eingedrungene Mikroorganismen zunächst physikalische Barrieren überwinden. Die Erkennung des Pathogens und erste Abwehrreaktionen erfolgen anschließend durch die Zellen des angeborenen Immunsystems mithilfe von Pattern Recognition Receptors (PRR), die sich z.B. auf Makrophagen, dendritischen Zellen und Monozyten befinden. Bis heute sind vier PRR-Familien bekannt: Toll-like Rezeptoren (TLR), NOD-like Rezeptoren (NLR) und C-Typ-Lektin-Rezeptoren sowie die RIG-I-Helikase. Diese erkennen hoch konservierte Pathogen-spezifische PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), zu denen neben Lipopolysacchariden (LPS),

Peptidoglykanen und Lipoteichonsäuren auch bakterielle Nukleinsäuren gehören. Die PAMP–PRR-Interaktion initiiert eine intrazelluläre Signalkaskade, die zur Sezernierung von Chemokinen und Zytokinen führt, wobei sich das Ausmaß der Reaktion abhängig von der bakteriellen Last, der Virulenz des Pathogens, von Komorbiditäten sowie genetischen Faktoren des Patienten unterscheiden kann²¹.

Dabei werden viele zelluläre Systeme, wie z.B. Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen aktiviert, die – neben anderen inflammatorischen Mediatoren – vor allem Chemokine und Zytokine sezernieren¹⁸. Auf eine adäquate inflammatorische Reaktion folgt eine aktive Resolution, in der apoptotische Zellen und Zelldebris phagozytiert und Gewebeschädigungen wieder repariert werden. Dabei liegt ein antiinflammatorisches Zytokinprofil vor. Eine gestörte Resolutionsphase kann dagegen zu einer systemischen inflammatorischen Überreaktion führen¹².

1.3. Monozyten

Monozyten sind zirkulierende Blutzellen, die einen Anteil von etwa 8% der peripheren humanen Leukozyten ausmachen²². Monozyten und sich daraus ausbildende Zellen sind gleichermaßen für das angeborene wie für das adaptive Immunsystem wichtig, da sie als Makrophagen eingedrungene Erreger phagozytieren, proinflammatorische Zytokine sezernieren oder aber als antigenpräsentierende Zellen das adaptive Immunsystem aktivieren²³. Sie gehören zum mononukleären phagozytischen System, dessen Namensgebung 1880 durch Elias Metchnikoff erfolgte. Dieser beschrieb als Erster das Prinzip der Phagozytose und stellte die Gesamtheit phagozytierender Zellen als „das Makrophagensystem“ vor. Es folgten neue Erkenntnisse in der Erforschung der gewebständigen Makrophagen, für die Ludwig Aschoff 1924 den Begriff des „retikuloendothelialen Systems“ (RES) prägte, der durch Volterras „retikulohistiozytäres System“ (RHS) ergänzt wurde. Erst 1969 wurde eine neue Klassifizierung für alle stark

phagozytotisch aktiven, mononukleären Zellen veröffentlicht: das „mononukleäre phagozytotische System“ (MPS). Im Gegensatz zum RHS und RES, die alle phagozytierenden Zellen des Organismus zusammenfassen, die zur zellulären Abwehr gehören, beschreibt das MPS nur Monozyten, Makrophagen und ihre Vorläufer^{22,24}.

Monozyten entstehen im Knochenmark und sind hämatopoetischen Ursprungs. Über mehrere Zwischenstufen differenzieren sie sich aus Makrophagen- und dendritischen Zellvorläufern (*macrophage/dendritic cell progenitors*, MDPs) und werden anschließend aus dem Knochenmark in die periphere Blutzirkulation ausgeschwemmt.

Monozyten werden anhand ihrer Oberflächenrezeptoren CD14, CD16 und CCR2 klassifiziert. CD14⁺⁺CD16⁻ CCR2⁺⁺ Monozyten werden auch als klassische Monozyten bezeichnet und stellen mit 90–95% des gesamten Monozytenpools im menschlichen Blut den größten Anteil²⁵. Durch ihre hohe Expression an Rezeptoren für proinflammatorische Chemokine (CCR1, CCR2, CCR5) sind die klassischen Monozyten dazu prädestiniert, im Falle von Veränderungen des chemotaktischen Gradienten in inflammatorisches Gewebe einzuwandern.

Die CD16⁺ Monozyten werden aufgrund ihrer CD14-Expression nochmals unterteilt in die intermediären CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten und die nichtklassischen CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten. Beide Monozytengruppen werden durch die Expression des Fractalkinrezeptors CX3CR1 charakterisiert, sie sind in ihrer Funktion aber sehr unterschiedlich. Intermediäre Monozyten werden aus einer CCR2⁺⁺ monozytären Zwischenstufe gebildet und sind aufgrund ihrer Antwort auf TLR2- und TLR4-Liganden proinflammatorisch. Den nichtklassischen Monozyten wird eine patrouillierende und über TLR7 und TLR8 vermittelte antivirale Rolle zugeschrieben^{6,26–28}.

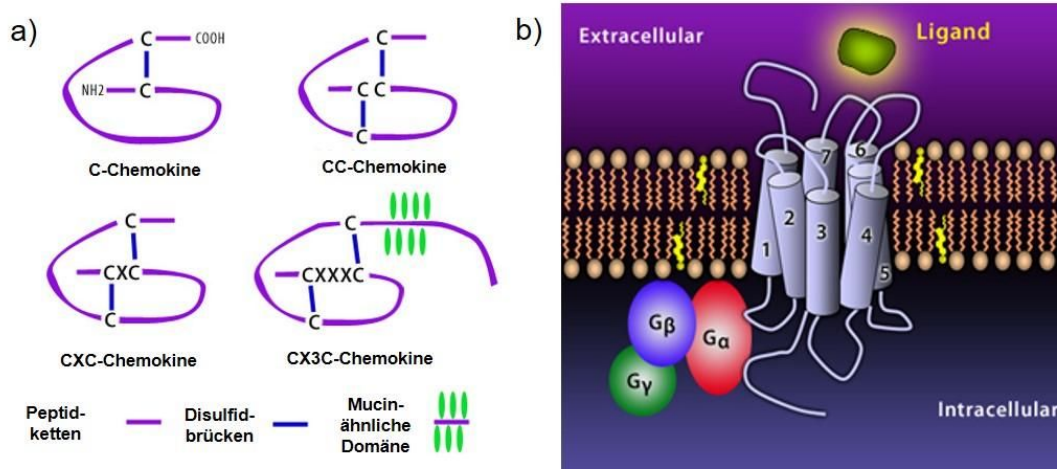
1.4. Chemokine

1.4.1. Chemokinbiologie

Die Migration von Monozyten wird von Chemokinen reguliert. Chemokine sind kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von 8–12 kDa, die sich anhand ihrer vier Cysteinreste an hoch konservierten Positionen klassifizieren lassen. Je nach Anordnung zweier dieser Cysteinreste an ihrem aminoterminalen Ende unterteilt man die Chemokine in zwei Hauptgruppen: die CXC-Chemokine, die durch einen Aminosäurerest zwischen den beiden N-terminalen Cysteinresten gekennzeichnet sind, und die CC-Chemokine, bei denen diese beiden Cysteine direkt benachbart liegen. CCL2 (MCP-1) ist aufgrund seiner bislang besten Charakterisierung der Prototyp der CC-Chemokine, der größten Gruppe der Chemokine²⁹.

Zur Gruppe der Chemokine gehören außerdem drei homologe Moleküle: CX3CL1, auch Fractalkin genannt, bei dem drei Aminosäuren zwischen den beiden aminoterminalen Cysteinresten liegen, und XCL1 und XCL2, denen zwei der vier kanonischen Cysteine fehlen^{30,31}.

Alle der 43 bislang bekannten Chemokine üben ihre Funktionen über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen aus, von denen bislang 19 beschrieben sind.



Quelle: biolegend.com

Abb. 1:

Chemokine und ihre Rezeptoren

- Vereinfachte Darstellung der Chemokingruppen. Anhand der Anordnung der Cysteinreste am Amino-terminalen Ende werden sie in 4 Gruppen unterteilt (C-, CC-, CXC-, CX3C-Chemokine).
- Schematische Darstellung der Chemokinrezeptoren. Es handelt sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die sieben membrandurchspannende Helices besitzen. Der Aminoterminal mit den extrazellulären Schleifen ist für die Ligandenspezifität verantwortlich, die G-Proteine am Carboxyterminus für das Downstream-Signaling.

1.4.2. Die Rolle von CC-Chemokinrezeptor 2 auf Monozyten in der Inflammation

Der Ligand CCL2, der nach seiner Erstbeschreibung auch als Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) bekannt ist, stellt ein besonders potentes Chemoattraktans für Monozyten dar. *In vitro* liegt die mittlere effektive Wirkdosis (ED_{50}) bei etwa 500 pmol/L. Während die Expression seines Rezeptors CCR2 nur auf wenige Zellarten beschränkt ist (Monozyten, unreife dendritische Zellen, Gedächtnis-T-Zellen), exprimieren nahezu alle kernhaltigen Zellen CCL2. In der Homöostase wird CCL2 in geringen Mengen exprimiert. Unter

inflammatorischen Bedingungen wird das Protein von eingewanderten PMN im inflammatorischen Areal, aber auch von Makrophagen, Lymphozyten, Basophilen, Epithel- und Endothelzellen und Fibroblasten als Antwort auf proinflammatorische Zytokine oder mikrobielle Moleküle (z.B. IL-1, Tumornekrosefaktor (TNF), Interferon (IFN) und LPS) sezerniert³².

Der Rezeptor CCR2 besitzt zwei Isoformen, CCR2a und CCR2b, mit alternativen Spleißvarianten an den intrazellulären carboxyterminalen Enden. Die extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne ist bei beiden Isoformen identisch. In humanen Monozyten sind Transkripte für beide Isoformen vorhanden, CCR2b stellt jedoch die dominierende Spleißvariante dar (90% des auf der Zelloberfläche detektierbaren CCR2). CCR2b ist die kürzere der beiden Isoformen und unterscheidet sich hinsichtlich seiner 3' untranslatierten Region (3'-UTR) von der längeren Isoform CCR2a. Der CCL2-Signalweg wird nur über die kürzere Spleißvariante CCR2b vermittelt^{33,34}.

In Mausmodellen wurde gezeigt, dass der Rezeptor CCR2 und sein Ligand CCL2 sowohl in der Chemotaxis als auch in der endothelialen Adhäsion von Monozyten essenziell sind: Durch eine verminderte Monozytenrekrutierung zeigte sich bei CCR2^{-/-} und bei CCL2^{-/-} Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Listeria*-Infektionen²⁸. Eine *Mycobacterium tuberculosis*-Infektion führte als Folge der gestörten Monozytenrekrutierung in den CCL2^{-/-} und CCR2^{-/-} Mäusen zu einer höheren Mortalität als in Wildtyp-Mäusen. Es konnte zudem ein vermindertes Trafficking antigenpräsentierender Zellen gefunden werden, was zu einer gestörten Differenzierung von Typ-1-T-Helferzellen (Th1-Zellen) mit nachfolgender Verminderung der IFN- γ -Produktion führt^{28,35}.

Neben der Chemotaxis kommt den klassischen CCR2⁺⁺ Monozyten auch eine wichtige Rolle bei der Festlegung der Intensität und Länge der Inflammation zu. Bei intratrachealer LPS-Applikation war die CCL2-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit

(BALF) von CCR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zehnfach erhöht. Dies deutet darauf hin, dass rekrutierte CCR2⁺⁺ Monozyten durch die Bindung ihres Liganden die CCL2-Konzentration im inflammatorischen Areal senken, die weitere Rekrutierung klassischer CCR2⁺⁺ Monozyten beenden und somit die Homöostase einleiten³⁶.

1.5. Die Chemotaxis

Sowohl während der Homöostase als auch in der Inflammationsphase zirkulieren Monozyten durch den Blutstrom, um diesen dann aufgrund von lokalen chemotaktischen Gradienten zu verlassen. Die Rekrutierung der zirkulierenden Monozyten zum Infektionsherd durch Chemotaxis und die Diapedese durch das Endothel sind dabei entscheidende Ereignisse im Rahmen der Inflammation³⁷.

Die Chemotaxis wird durch sezernierte Chemokine und ihre jeweiligen Rezeptoren auf den Zellen kontrolliert. Dies führt zur Migration zum Infektionsherd und anschließender Extravasation in das infizierte Gewebe³⁸. Klassische Monozyten (CD14⁺⁺CD16⁻ CCR2⁺⁺) werden CCR2-abhängig aus dem Knochenmark ins Blut ausgeschwemmt. Kleinste Mengen des Liganden CCL2 reichen unter homöostatischen Bedingungen aus, dass Monozyten das Knochenmark verlassen und den Pool zirkulierender Monozyten im Blut aufrechterhalten¹. Unter inflammatorischen Bedingungen steigt die Konzentration des Chemokins CCL2 deutlich an und der klassische CD14⁺⁺CD16⁻ CCR2⁺⁺ Monozyt wandert CCR2-vermittelt aus der Zirkulation entlang des Konzentrationsgradienten zum Infektionsherd. Da der größte Anstieg der CCL2-Konzentration durch die zunächst rekrutierten PMN erzielt wird, folgt eine Einwanderung von klassischen Monozyten nach frühestens 6 Stunden und kann bis zu 3 Tage anhalten²². Im entzündeten Areal nehmen die Monozyten ihre phagozytotischen, proteolytischen und inflammatorischen Funktionen auf und sezernieren dabei IL-12, Stickoxide, TNF- α und IL-1^{4,6,27,39}. Eine weitere Eigenschaft der CD14⁺⁺ klassischen Monozyten ist neben der Differenzierung zu Makrophagen die Ausdifferenzierung zu

dendritischen Zellen. Unter dem Einfluss von Granulozyten-/Makrophagenkolonien stimulierendem Faktor (GM-CSF), IL-4 und TNF- α bzw. eines TLR-Liganden entwickeln sich diese spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen, die im Gegensatz zu Makrophagen noch in der Lage sind zu migrieren²².

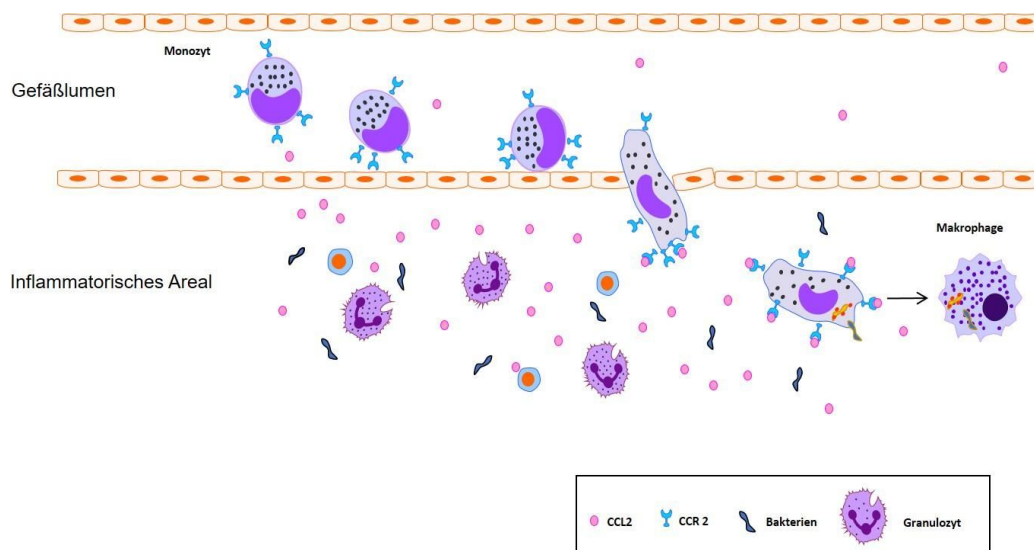


Abb. 2:

Chemokin-induzierte Migration von Monozyten ins inflammatorische Areal, (modifiziert nach Imhof et al, 2004⁴⁰)

Aktivierung Gewebe-ständiger Immunzellen durch pro-inflammatorische Zytokine oder mikrobielle Moleküle führt zur vermehrten Sezernierung von CCL2. Monozyten wandern CCR2-vermittelt entlang des Konzentrationsgradienten und transmigrieren aus dem Gefäßlumen in das entzündete Gewebe. Konditionierung durch lokale Wachstumsfaktoren, Zytokine und mikrobielle Produkte führt zur Ortsständigkeit der Monozyten und Ausdifferenzierung zu Makrophagen⁶

1.6. Monozytenadhäsion

Während Leukozyten in der Homöostase durch die hohe Fließgeschwindigkeit vorwiegend in der Mitte von kleinen Blutgefäßen zu finden sind, führt die lokale Vasodilatation im Rahmen

der Inflammation dazu, dass sie in die Nähe des Gefäßendothels gelangen und mit diesem in Wechselwirkung treten können⁴¹. Diese Wechselwirkungen laufen kaskadenartig ab und sind sehr fein reguliert.

Eine vermehrte IL-8-Sezernierung rekrutiert PMN als erste Antwort des Immunsystems zum Infektionsherd. TNF- α und IL-1 β , die ebenfalls von den Gewebsmakrophagen sezerniert werden, induzieren die schnelle Expression von Adhäsionsmolekülen und führen durch die Aktivierung des Endothels dazu, dass CCL2, CCL5 und IL-8 an transmembranständigen Heparansulfat-Proteoglykanen auf der luminalen Oberfläche exprimiert werden und so einen Matrix-assoziierten Konzentrationsgradienten bilden. PMN werden im frühen Stadium der Inflammation vorwiegend durch IL-8 zum Infektionsherd gelockt. Die Rekrutierung von Leukozyten ist der zweite Schritt in der Immunantwort, der hauptsächlich durch das von den PMN sezernierte CCL2 vermittelt stattfindet⁴².

Die Adhäsion lässt sich in einzelne Stadien unterteilen, in denen unterschiedliche Adhäsionsmoleküle die Wechselwirkung mit dem Endothel vermitteln. Die Selektine (E-Selektin, P-Selektin) sind die erste Familie der Adhäsionsmoleküle, die im Rahmen der Leukozytenadhäsion beim sogenannten „Rolling“ eine wichtige Rolle spielen. Das Rollen der Monozyten entlang des aktivierten Endothels führt zur Reduktion der Geschwindigkeit der Zellen und ermöglicht ihre Stimulation durch die auf dem Endothel präsentierten Chemokine, was zur Expression weiterer Oberflächenintegrine führt³⁷. Das Rolling ist ein reversibler Prozess und stellt aufgrund der Zellaktivierung eine Grundvoraussetzung für die sich anschließende feste Bindung dar. Diese wird durch die Interaktion von Integrinen auf den Monozyten (LFA-1, Mac-1) mit Vertretern aus der Immunglobulin-Superfamilie (ICAM-1, ICAM-2) auf der Endothelzelloberfläche vermittelt^{40,43}.

Die sich anschließende Diapedese und Wanderung des Monozyten durch die Endothelschicht und die Basalmembran wird hauptsächlich durch LFA-1 auf den Monozyten

und funktionale Adhäsionsmoleküle (JAMs), ebenfalls auf den Monozyten, aber auch in den Tight Junctions des Endothels, ausgeführt (parazelluläre transendotheliale Migration (TEM)). Nur in weniger als 10% der Fälle wählt der Monozyt den transzellulären Weg durch das endotheliale Zytoplasma (intrazelluläre TEM)³⁷. Ist der Monozyt im entzündeten Areal angekommen, wird er dort ortsständig, indem er die Chemokinrezeptoren vermindert exprimiert und somit keine Chemotaxis mehr betreiben kann³³.

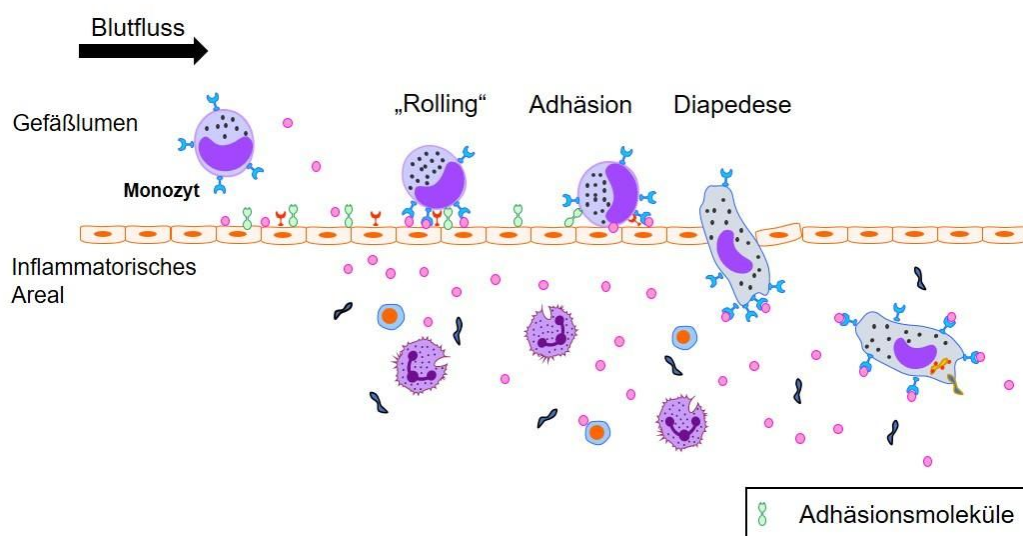


Abb. 3:

Die Adhäsionskaskade von Monozyten nach Rekrutierung zum Infektionsherd

Der Monozyt vermindert beim Rolling die Geschwindigkeit und wird durch die auf den Endothelzellen exprimierten Chemokine, vor allem CCL2, stimuliert. Dies führt zur vermehrten Expression von Oberflächenintegrinen, der Monozyt adhärert fest an das Endothel, um anschließend durch dieses hindurch zu migrieren (parazelluläre transendotheliale Migration).

1.7. Resolution

Der ortsständige Monozyt differenziert sich zum Makrophagen aus und nimmt seine Effektorfunktionen auf: Er phagozytiert apoptotische Zellen und Zelldebris und sezerniert Stickstoffoxide, IL-12, TNF-a und IL-1, um eingedrungene Mikroorganismen abzutöten,

zerstörtes Gewebe zu beseitigen und weitere Entzündungszellen zu rekrutieren²⁷. Um die inflammatorischen Vorgänge schließlich zu beenden und einer unkontrollierten Gewebeschädigung durch die proinflammatorische Monozytenantwort entgegenzuwirken, wird die Resolution der Inflammation eingeleitet. Nach alternativer Aktivierung von ortsständigen Makrophagen durch z.B. Alarmine, IL-4 und IL-13 ändert sich deren Phänotyp: Neben der Expression von antiinflammatorischen Faktoren (Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1RA), Interleukin-10 Rezeptor (IL-10R)) werden auch wundheilungsfördernde, proangiogenetische und profibrotische Faktoren exprimiert (Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF- β 1), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Wnt-Liganden, Matrix-Metalloproteinasen)^{5,27}.

1.8. microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, nichtkodierende RNA-Moleküle mit einer Länge von etwa 22 Nukleotiden, die posttranskriptionell über komplementäre Basenpaarung an die 3'-UTR ihrer Zieltranskripte binden und so die Synthese eines aktiven Proteins verhindern.

Die Idee, dass diese nichtkodierenden RNA-Moleküle in der Lage sein könnten, das Paradigma der linearen Korrelation zwischen mRNA und Proteinexpression zu durchbrechen, entstand schon 1993. Lee et al. konnten zeigen, dass das Gen *lin-4* in *Caenorhabditis elegans* nicht für ein Protein kodiert, sondern dass sein Transkript vielmehr in der Lage ist, als kleine RNA die Expression des lin-14-Proteins zu regulieren⁴⁴. Kurze Zeit später identifizierten Bartel et al. let-7, eine kleine nichtkodierende RNA, die auf ähnliche Weise agierte, in verschiedenen Spezies wie u.a. auch in *Homo sapiens*⁴⁵. Heute sind 1881 humane miRNAs bekannt, deren Funktion und Bedeutung in der Regulation nahezu aller relevanten biologischen Prozesse intensiv erforscht wird. Man geht davon aus, dass miRNAs mehr als 30% aller proteinkodierenden Gene im Menschen regulieren und dass sie

nicht nur in der Homöostase, sondern auch im Rahmen pathologischer Prozesse eine kritische Rolle spielen⁴⁶.

1.8.1. Biogenese von microRNAs

miRNA kodierende Gene sind im menschlichen Genom heterogen lokalisiert. Sie können sowohl in den Introns sogenannter Wirtsgene (kodierend oder nichtkodierend) liegen, mit denen sie sich dann regulatorische Elemente und das Primärtranskript teilen (intragen), als auch intergenisch in nicht proteinkodierenden Regionen lokalisiert sein. In dem Fall besitzen sie einen eigenen Promotor oder liegen als Cluster vor und werden gemeinsam transkribiert^{45,46}.

Die Biogenese von miRNAs umfasst mehrere Prozessierungsschritte und beginnt im Zellkern. Von einer RNA-Polymerase II transkribiert entsteht ein Primärtranskript, das in seiner Länge sehr unterschiedlich sein kann, bis hin zu mehreren Tausend Nukleotiden. Diese sogenannte primäre microRNA (pri-microRNA) besitzt einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende und ein 7-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende, das sich zu einer Schleife zusammenlagert. Das Primärtranskript wird anschließend durch einen Mikroprozessorkomplex prozessiert, der aus Drosha, einer Ribonuclease III (RNase-III) und deren Cofaktor DGCR8 (DiGeorge Syndrom Critical Region 8; eine Bindedomäne für doppelsträngige RNA (dsRNA)) besteht. Dabei entsteht ein ungefähr 70 Nukleotide großer Vorläufer der miRNA (sog. prä-microRNA), der einen 2 Nukleotide langen 3'-Überhang besitzt und eine charakteristische haarnadelförmige Struktur aufweist⁴⁷. Diese prä-microRNA wird dann aktiv mithilfe des Überhangs und vermittelt durch Ran-GTP durch den Exportrezeptor Exportin 5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma wird Ran-GTP hydrolysiert, die prä-microRNA wird aus dem Transportkomplex gelöst und durch Dicer, eine weitere RNase III (eine Endonuklease) im Zytoplasma, geschnitten. Es entsteht eine 21–25 Nukleotide lange dsRNA, die sowohl die reife miRNA enthält als auch

ein Fragment derselben Größe, das sich vom entgegengesetzten Arm der prä-microRNA ableitet und als microRNA* bezeichnet wird⁴⁵.

Durch die Prozessierung der prä-microRNA durch Dicer entstehen unterschiedliche Stabilitäten der 5'-Enden beider Arme, wobei aus dem Arm mit dem instabileren 5'-Ende die funktionell aktive miRNA entsteht, während die microRNA* meist degradiert wird. Die reife miRNA wird in einen Multiproteinkomplex, den RNA-Induced Silencing Complex oder RISC, inkorporiert, der dann die Erkennung des Targets vermittelt⁴⁸.

1.8.2. Post-transkriptionelle Regulation von Zielgenen durch microRNAs

Eine eukaryotische proteinkodierende mRNA besteht aus einem Open Reading Frame (ORF), der durch eine 5'-UTR und eine 3'-UTR flankiert wird⁴⁹. Die reife miRNA, die in den RISC geladen ist, vermittelt ihre posttranskriptionelle Repression über Watson-Crick-Basenpaarung mit der 3'-UTR der komplementären mRNA⁵⁰. Dabei ist nur im Bereich der Seed-Sequenz der miRNA, die die Nukleotide 2–8 vom 5'-Ende der miRNA bilden, eine nahezu vollständige Komplementarität zur 3'-UTR des Zieltranskripts erforderlich. Deren Komplementaritätsgrad entscheidet über den weiteren Mechanismus. Liegt eine vollständige Komplementarität vor, kommt es zur Degradierung der mRNA, während eine partielle Komplementarität die Inhibierung der Translation zur Folge hat^{45,51}. Dadurch, dass miRNAs für ihre posttranskriptionelle Regulationsaktivität nicht zwangsläufig eine vollständige Komplementarität und Basenpaarung aufweisen müssen, kann eine miRNA die Expression vieler verschiedener Zielgene regulieren. Andererseits kann ein Zielgen aber auch durch viele verschiedene miRNAs reguliert werden⁵².

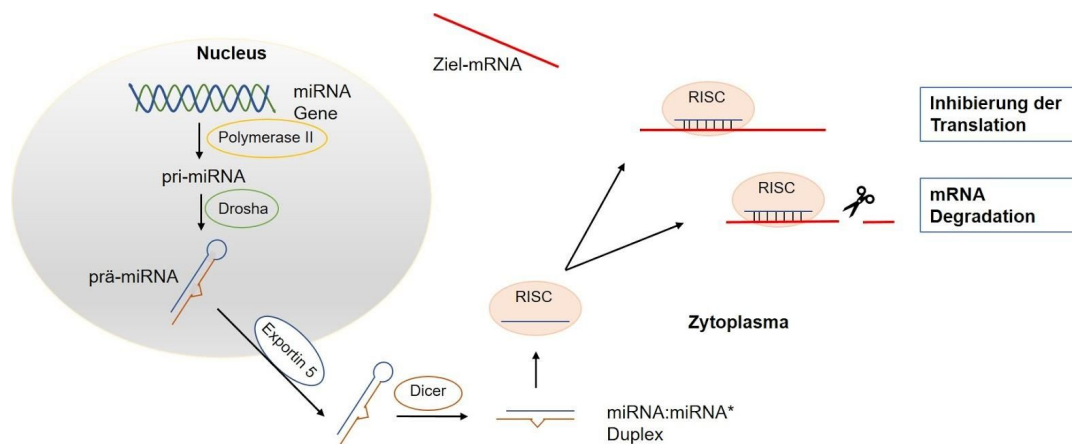


Abb. 4:

Die Biogenese von microRNAs (nach He et al, 2004⁴⁸)

RNA Polymerase II prozessiert im Nucleus das Primärtranskript (pri-miRNA), welches durch Drosha in die prä-miRNA prozessiert wird. Diese Vorläufer-miRNA wird anschließend mittels Exportin 5 in das Zytoplasma geschleust und dort enzymatisch in einen miRNA:miRNA*-Doppelstrang umgewandelt. Die reife miRNA wird in den RISC integriert und bindet über Watson-Crick Basenpaarung an die komplementäre Ziel-mRNA, woraufhin deren Translation inhibiert wird oder die mRNA degradiert.

1.8.3. MicroRNAs in der Sepsis und im ARDS

Eine Vielzahl von Studien hat belegt, dass miRNAs ein Knotenpunkt im regulatorischen Netzwerk einer inflammatorischen Antwort sind. Zielgene kodieren unter anderem für zentrale Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NFκB oder Hypoxie-induzierter Faktor 1α (HIF-1α) und Zelloberflächenrezeptoren wie die TLR. miRNAs regulieren auch Chemokine und ihre Rezeptoren und haben damit Einfluss auf die Entwicklung, Funktion und Differenzierung der Zellen des adaptiven wie auch des angeborenen Immunsystems.

Auch als mögliche valide Biomarker in intensivmedizinischen Krankheitsbildern, wie z.B. der Sepsis und dem akuten Lungenversagen, haben miRNAs an Bedeutung gewonnen: Studien an Plasma bzw. Serum, Vollblut oder aus Vollblut isolierten Immunzellen bei Sepsis im

Vergleich zu gesunden Probenquellen bzw. an Überlebenden im Vergleich zu nicht Überlebenden konnten zeigen, dass miRNAs während einer Sepsis differenziell exprimiert werden und das Krankheitsgeschehen beeinflussen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression der microRNA 155 (miR-155) zu einem vermehrten Vorkommen von CD39⁺ regulatorischen T-Zellen (Tregs) führt, was eine Immunsuppression zur Folge hat und somit eine schlechtere Prognose bei Sepsis-Patienten bedeutet⁵³. Roderburg et al.⁵⁴ konnten zeigen, dass die Serumkonzentrationen von miR-150 mit dem Schweregrad der Sepsis korrelieren.

Das akute Lungenversagen ist durch aktivierte Immunzellen und eine exzessive Zytokin- und Proteasenfreesetzung in den Alveolarraum charakterisiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass immunmodulatorische Biomarker der Sepsis einen diagnostischen Wert für das akute Lungenversagen besitzen könnten. Überraschenderweise gibt es wenige Studien, die miRNAs während eines akuten Lungenversagens als Biomarker untersuchen. Lediglich eine Studie, die 45 Patienten mit akutem Lungenversagen nach Herzschrittmacher-Implantation analysierte, fand sechs signifikant hochregulierte und fünf signifikant herunterregulierte miRNAs. Die Untersuchung der Auswirkungen dieser differenziell regulierten miRNAs beim akuten Lungenversagen steht allerdings noch aus⁵⁵.

Viele tierexperimentelle Studien, vor allem an Nagetieren, zeigten die differenzielle Regulation von mehreren miRNAs. Ein Konsensus bezüglich ihres Nutzens bei der Entwicklung oder der Resolution des akuten Lungenversagens ist jedoch noch nicht gefunden worden.

Zusammenfassend wird deutlich, dass miRNAs sowohl einen diagnostischen als auch einen therapeutischen Nutzen bei der Erkennung und Therapie intensivmedizinischer Krankheitsbilder bringen könnten⁴⁶. Zuvor ist jedoch ein noch besseres Verständnis der miRNA-regulierten Prozesse unabdingbar.

2. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Die Migration von Monozyten ist ein eng regulierter Prozess, der maßgeblich von Chemokinen vermittelt wird. Durch Chemokin-vermittelte Chemotaxis werden Monozyten zum Infektionsherd rekrutiert. Dort beginnt der Monozyt mit dem reversiblen Rollen entlang des Endothels, bevor er durch auf dem Endothel exprimierte Chemokine aktiviert wird, eine festere Bindung eingeht und anschließend durch das Endothel migriert. Im entzündeten Areal angekommen, wird der Monozyt ortsständig, was ebenfalls über die Expressionsmuster von Chemokinen und ihren Rezeptoren koordiniert wird. Wie genau die unterschiedliche Expression der Chemokine und ihrer Rezeptoren im Verlauf der Chemotaxis und Migration gesteuert wird, ist bislang noch ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass miRNAs an der Regulation der Chemokinrezeptoren beteiligt sind und dass diese somit das komplexe Geschehen der Monozytenrekrutierung koordinieren.

Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

1. Werden Chemokinrezeptoren durch miRNAs direkt reguliert?
2. Wie werden die Monozytenfunktionen durch miRNAs beeinflusst?
3. Hat dies eine Relevanz für Sepsis-Patienten?

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Kultivierung von Zellen

Sämtliche Zelllinien wurden in zellspezifischem Medium (siehe Tab.1) in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ bei hoher Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heraeus) kultiviert.

Die Durchführung aller sterilen Arbeiten erfolgte unter einer Umluft-Sterilbank (Heraeus).

Adhärente Zelllinien wurden mittels Trypsin/EDTA-Lösung vom Zellkulturflaschenboden gelöst und in PBS-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Sämtliche Zelllinien wurden proliferationsabhängig passagiert.

<i>Tab. 1:</i> Verwendete Zellen und Zelllinien			
Zelllinie	Beschreibung	Zentrifugation	Kulturmedium
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen; Adhärente Zellen	3 Minuten, 1700 x g, RT	HEK-Medium
THP-1	Akute myeloische Leukämie; Suspensionszellen	3 Minuten, 1700 x g, RT	RPMI+10%FCS
Primäre humane Monozyten	Isolation aus Apherese-Set (siehe 3.1.3.); Suspensionszellen	5 Minuten, 300 x g, RT	RPMI+20%FCS
HUVEC	Isolation aus frischer Nabelschnur (siehe 3.9.1.); Adhärente Zellen	5 Minuten, 300 x g, RT	Endothelial Cell Growth Medium

3.1.2. Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Der Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer ist ein elektronisches Zellzählgerät mit Bildanalyse, das eine Standard-Trypanblau-Färbung zur Bestimmung der Zellzahl und -viabilität nutzt. Hierbei werden vitale Zellen ungefärbt dargestellt, tote Zellen und Zelltrümmer allerdings nehmen durch ihre aufgehobene Integrität der Zellmembran den blauen Farbstoff auf. Die Zellviabilität ergibt sich aus dem prozentualen Verhältnis von ungefärbten Zellen zur Gesamtzellzahl. Für die Versuche wurden nur Zellen verwendet, deren Gesamtviabilität bei > 90% lag. Die benötigte Zellzahl für die Versuchsansätze wurde nur aus den lebenden Zellen bestimmt.

3.1.3. Gewinnung primärer humaner Monozyten

In dem Apherese-Set der Thrombozytenspende befindet sich eine Leucoreduction System Chamber ("Kegel"), in welchem sich periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) aufkonzentriert ansammeln. In den darin enthaltenen 6-9 mL Blut befindet sich eine höhere Anzahl an humanen Monozyten, die nicht durch die venöse Abnahme peripheren Blutes von Spendern zu erreichen ist. Um das Blut aus dem Kegel zu entnehmen, wurde dieser an beiden Zuläufen vom Apherese-Set abgeklemmt und herausgeschnitten. Anschließend wurde mit Hilfe einer leeren Spritze mit aufgesetzter Kanüle das Blut aus dem Kegel gedrückt. Das Blut wurde anschließend mittels Dichtegradientenzentrifugation in Zellfraktionen aufgetrennt. Hierzu wurden zunächst 3 mL Ficoll-Trennlösung (Histopaque-1077, Dichte=1,077g/mL) in einem 14 ml Mikroröhrchen vorgelegt, auf welche jeweils 3 mL Citrat-Vollblut aus dem Apherese-Kegel geschichtet wurden. Nach anschließender Zentrifugation (17 Minuten, 400 x g, 4°C, langsame Beschleunigung, langsame Bremse) waren vier Phasen sichtbar: die obere Phase bestehend aus Plasma und Thrombozyten, darunter liegend die ringförmige, weiße Interphase mit den

mononukleären Zellen (Mono- sowie Lymphozyten), anschließend eine Phase farblose Ficoll-Lösung und als Pellet im Konus des Zentrifugenröhrchens die Erythrozyten und Granulozyten, die eine rote Phase bilden.

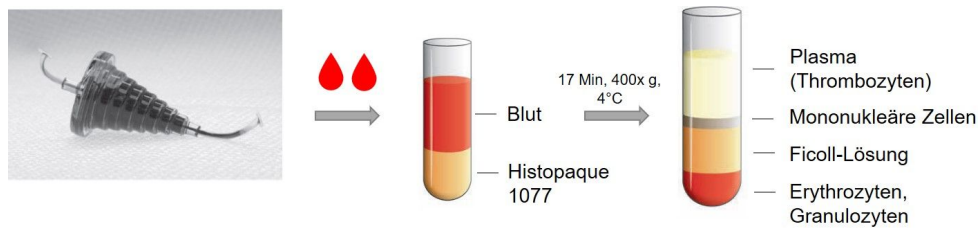


Abb. 5:

Gewinnung primärer humaner Monozyten

Das Blut aus der Leucoreduction System Chamber („Kegel“) wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation über Histopaque-1077 in vier Zellfraktionen aufgetrennt.

Quelle: GE Healthcare Life Sciences

Die monozyten- und lymphozytenreiche Interphase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgten mehrere Wasch- (PBS) und Zentrifugationsschritte (10 Minuten, 200 x g, 4°C, langsame Beschleunigung, keine Bremse), um verbliebene Thrombozyten und Ficollreste zu entfernen. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 mL PBS aufgenommen, um Zellzahl und -viabilität zu bestimmen.

7 mL Citrat-Vollblut aus dem Kegel führten zu einer PBMC-Ausbeute von 300-700 x 10⁶ Zellen bei einer guten Zellviabilität von ca 94-97%.

3.1.4. Immunomagnetische Monozyten-Separation

Pan-Monozyten, bestehend aus klassischen $CD14^{++}CD16^{-}$, nicht-klassischen $CD16^{++}CD14^{+}$ und intermediären Monozyten $CD16^{+}CD14^{++}$ wurden mittels magnetischer Zellseparation (Magnetic Activated Cell Sorting; MACS) aus mononukleären Zellen gewonnen. Dafür wurden spezifische, gegen Oberflächenantigene gerichtete Antikörper, die an magnetische Partikel gekoppelt sind, eingesetzt. Pan-Monozyten wurden mittels Negativ-Selektion isoliert: hierbei werden T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen und Basophile über eine indirekte, ferromagnetische Antikörperbindung an spezifische Oberflächenmoleküle in einem magnetischen Feld depletiert, während unmarkierte Monozyten die Säule ungehindert passieren und aufgefangen werden können.

Zunächst wurde dafür die benötigte Zellzahl mononukleärer Zellen erneut 10 Minuten bei $300 \times g$ zentrifugiert, der Überstand komplett entfernt und die Zellen in MACS Puffer aufgenommen ($30 \mu\text{l}$ pro 1×10^7 Zellen). Anschließend wurde ein FcR-Block durchgeführt, um die Spezifität der Bindung der Biotin-Antikörper an alle nicht-monozytären Zellen zu erhöhen ($10 \mu\text{l}$ pro 1×10^7 Zellen). Folgend wurde ein sogenannter "Biotin-Antikörper-Cocktail" dazugegeben, der Biotin-konjugierte Antikörper gegen Oberflächenmoleküle der nicht-monozytären Zellen enthält. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach erneuter Zugabe von MACS-Puffer ($30 \mu\text{l}$ pro 1×10^7 Zellen) wurden $20 \mu\text{l}$ einer mit ferromagnetischen Micro-Beads gekoppelten Anti-Biotin-Antikörper-Lösung zugemischt. Der Ansatz wurde für 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert.

Es folgte die magnetische Separation mittels MACS Separations LS Säule durch Auftragen der Zellsuspension auf die Säule. Die Micro-Beads-gekoppelten Zellen verblieben auf der Säule und die Pan-Monozyten wurden unterhalb der Säule in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Säule wurde anschließend noch drei Mal mit 3 mL Puffer A gewaschen

und die gesamte Monozytensuspension bei 200 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 1 mL PBS resuspendiert. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl und -viabilität.

3.1.5. Stimulation der Monozyten

Frisch isolierte Monozyten wurden je nach Versuchsansatz stimuliert. Zur Ausdifferenzierung wurden Monozyten über 6 Tage mit 50 ng/mL M-CSF stimuliert. Monozyten, die sich zu Makrophagen ausdifferenzieren, werden adhärent, sodass nach jeweils zwei Tagen das Medium abgenommen und erneuert werden konnte. Die M-CSF-Konzentration wurde über den gesamten Differenzierungszeitraum beibehalten.

Zur LPS-Stimulation wurden die Monozyten eine Stunde nach Aussaat mit 50 ng/mL LPS oder 0,5 ng/mL (entspricht der Konzentration im Blut eines Patienten in der Sepsis) versetzt, um anschließend nach 3,5 Stunden (zur Rekonstruktion der Frühphase der Sepsis) oder 20 Stunden geerntet zu werden.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. DNA-Extraktion

Genomische DNA wurde unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits nach Angaben des Herstellers (Qiagen) aus 80 µl heparinisiertem Vollblut gesunder Probanden extrahiert. Nach der Lyse der Proben wird die DNA auf einer Silica-Membran einer DNase-freien QIAamp MinElute Säule gebunden, um anschließend nach zwei Waschschritten mittels Nuklease-freiem Wasser eluiert zu werden. Die Quantifizierung der DNA-Konzentration erfolgte am Nano Drop 2000-Spectrophotometer. Dieser misst bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD 260) als auch 280 nm (OD 280), wobei die OD280 als Maß für mögliche Verunreinigungen durch Proteine oder Alkoholreste dient. Der Quotient aus OD260 und

OD280 beschreibt die Reinheit der isolierten DNA. Reine DNA weist einen OD260/OD280-Quotienten von 1,8 auf.

3.2.2. RNA-Extraktion

RNA zur Bestimmung der mRNA-Expression der Zielgene wurde mit Hilfe des RNAqueous RNA Isolation Kit aus humanen primären Monozyten oder PBMC extrahiert. Es handelt sich hierbei um eine phenolfreie Isolierung der Gesamt-RNA, bei der die Zellen zunächst denaturiert werden. Das RNA-haltige Lysat wird mit 64%-igem Ethanol versetzt und auf einen Glasfaserfilter gegeben, in dem die RNA gebunden und mittels dreier Waschschrirte aufgereinigt wird. Die Elution erfolgt mit Nuklease-freiem Wasser.

Zur Quantifizierung der miR-125a-Expression in den Proben von Sepsis-Patienten bzw. gesunder Spender wurde Gesamt-RNA mit dem mirVana™ miRNA Isolation Kit extrahiert. Die Zellen wurden auch hier zunächst denaturiert, das RNA-haltige Lysat allerdings mittels Acid-Phenol-Chloroform organisch extrahiert. Es folgt die Zugabe von Ethanol und die anschließende Aufreinigung über eine Silikatmembran und Elution mit Nuklease-freiem Wasser.

Nach jeder RNA-Isolierung wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um eine Kontamination mit DNA auszuschließen. Hierfür wurde zu der eluierten RNA 1x DNase-Puffer und 1µl Turbo-DNase (2 U/µl) gegeben und der ganze Ansatz 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die DNase durch Zugabe des DNase Inactivation Reagent für fünf Minuten bei Raumtemperatur inaktiviert und die Proben sodann bei 16 000 x g für 1,5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand entsprach der reinen RNA, die in ein Eppendorf-Cup überführt und deren Konzentration wiederum am Nano Drop 2000 Spectrophotometer bei 260 nm und 280 nm gemessen wurde. Zur qualitativen Beurteilung der RNA wurde der Quotient aus OD260 und OD280 hinzugezogen, der bei reiner RNA bei 2,0 liegt.

3.2.2.1. RNA-Isolierung aus dem Vollblut von Sepsis-Patienten

Vollblutproben septischer Patienten und gesunder Probanden wurden mittels PAXgene™ Blood RNA System gewonnen. Das PAXgene™ Blood RNA Blutentnahmeröhrchen enthält sowohl ein Zellyse-Reagenz, welches die sofortige vollständige Lyse sämtlicher Vollblutzellen veranlasst, als auch ein Additiv zur Stabilisierung der intrazellulären RNA. Mit Hilfe des PAXgene™ Blood RNA bzw. miRNA Kits wurde die RNA nach Protokoll isoliert.

3.2.3. cDNA-Synthese

Die reverse Transkription gleicher Mengen Gesamt-RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) erfolgte unter Verwendung des SuperScript III Reverse Transcriptase Kits (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Folgender endgültiger Reaktionsansatz ergibt sich dabei:

Gesamt-RNA (200 – 1000 ng)	10 µl
Oligo-dT Primer (50 µM)	1 µL
Random Hexamer Primer (50 µM)	1ul
dNTP Mix (10 mM)	1ul
5 x First Strand Buffer	4 µL
Dithiothreitol (0,1 M)	1 µL
RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/µL)	1 µL
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/µL)	1 µL

Hierbei wurde in einem ersten Inkubationsschritt zunächst die Mischung aus Gesamt-RNA, Random Hexamer-Primern, Oligo-dT Primern und dNTPs für fünf Minuten bei 65°C in einem

Mastercycler pro S Thermocycler inkubiert und anschließend eine Minute auf Eis gelagert. Im zweiten Inkubationsschritt wurden die restlichen Reagenzien sowie die Enzyme zu dem Ansatz pipettiert und erneut im Thermocycler unter folgenden Reaktionsbedingungen zur fertigen cDNA umgeschrieben:

- 1) 5 Minuten, 25°C
- 2) 45 Minuten, 50°C
- 3) 15 Minuten, 70°C

3.2.4. Quantifizierung der mRNA-Expression mit UPL-Sonden

Die real-time quantitative PCR, auch quantitative Echtzeit-PCR, ist eine Methode zur Amplifikation eines DNA-Templates bei gleichzeitiger sowohl absoluter Quantifizierung der amplifizierten Nukleinsäure-Menge durch eine Kalibrierkurve, als auch relativer Erfassung, durch Bezug auf ein mitbestimmtes Referenzgen.

Der sogenannte "Crossing Point" (Cp-Wert) entspricht dem Zyklus, an dem das freigesetzte Fluoreszenzsignal bei Amplifikation des Zielgens erstmalig signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Nach Überschreiten des Cp-Wertes ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produkts, eine Quantifikation ist nur in der exponentiellen Phase der PCR möglich.

Sämtliche Experimente wurden an dem LightCycler 480-Thermocycler durchgeführt.

Die relative Quantifizierung der mRNA-Expression der Zielgene erfolgte in Doppelbestimmungen mittels der unter 7.6.3.3. angegebenen Primer und Universal Probe Library (UPL) Sonden, die das Fluoreszenzsignal mittels Fluoreszenz-Energie-Transfers (FRET) generieren. Diese sogenannten "Hydrolyse-Sonden" binden beim Annealing neben den sequenzspezifischen Primern im Bereich des Amplifikats. Ein dark Quencher am 3'Ende der Sonde verhindert eine messbare Lichtemission durch das Fluorescein, mit dem

die Sonde am 5'Ende markiert ist. Bei der Synthese des Komplementärstrangs wird die Sonde allerdings durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolytisch gespalten, Quencher und Fluorophor entfernen sich voneinander und es kann ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Die Quantifizierung erfolgte relativ zu zellspezifischen Referenzgenen. Für PBMC wurden SDHA und TBP als Referenzgene genutzt, bei Monozyten B2M und TBP.

Es wurde pro Reaktionsansatz 10 ng cDNA eingesetzt, der vollständige Reaktionsansatz (20 µL/well) setzte sich folgendermaßen zusammen:

cDNA (10ng/well)	5 µL
PCR-grade Nuklease-freies Wasser	4,4 µL
Forward Primer (20 µM)	0,2 µL
Reverse Primer (20 µM)	0,2 µL
UPL- Sonde	0,2 µL
LightCycler 480 Probes Master	10 µL

Nach einer initialen Denaturierung (10 Minuten, 95°C) wurden die Reaktionsansätze in 96-well LightCycler 480 Multiwell-Platten unter den folgenden Bedingungen amplifiziert:

45 Zyklen:

- 1) Denaturierung: 15 Sekunden: 95°C
- 2) Annealing: 30 Sekunden: 50°C
- 3) Elongation: 15 Sekunden: 72°C
30 Sekunden: 40°C

3.2.5. Quantifizierung der miR-125a-Expression

Nach initialer Isolation der RNA mittels mirVana miRNA Isolation Kit wurde diese mit Hilfe des TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben. Ein einfacher Ansatz bestand bei einem Gesamtvolumen von 6 µL aus:

Gesamt-RNA (2ng/µL)	3 µL
100mM dNTPs	0,09 µL
MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/µL)	0,6 µL
10x Reverse Transcription Buffer	0,9 µL
RNase Inhibitor (20 U/µL)	0,114 µL
PCR-Grade Nuklease-freies Wasser	0,696 µL
5x RT Primer für microRNA-125a-5p	1,8 µL
5x RT Primer für U47	1,8 µL

Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben in drei Schritten in komplementäre cDNA umgeschrieben:

1. Schritt: 30 Minuten, 16°C
2. Schritt: 30 Minuten, 42°C
3. Schritt: 5 Minuten, 85°C

Die Amplifikation der umgeschriebenen cDNA erfolgte anschließend in Duplikaten mittels spezifischer TaqMan Assays in einer Real-time PCR. Dabei wurde die MicroRNA 125a zur relativen Quantifizierung auf die U47-Referenz-RNA bezogen.

Ein Reaktionsansatz (20 µL) setzte sich folgendermaßen zusammen:

cDNA	5,0 µL
TaqMan miR-125a bzw U47 Assay	1,0 µL
LightCycler 480 Probes Master	10 µL
PCR-Grade Nuklease-freies Wasser	4,0 µL

Die Real-time Amplifikation erfolgte im Lightcycler 480 unter folgenden Reaktionsbedingungen:

- 1) 10 Minuten: 95°C
- 2) 50 Zyklen:
 - a) 15 Sekunden: 95°C
 - b) 60 Sekunden: 60°C
- 3) 30 Sekunden: 40°C

3.3. Klonierung der 3'UTR-Vektorkonstrukte von CCR2, JAM-A und JAM-L

3.3.1. Klonierung in den StrataClone PCR Cloning Vector

3.3.1.1. Amplifikation

Um ein Gen zu klonieren, muss dieses zunächst amplifiziert werden. Hierfür nimmt man die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Hilfe, die ausgehend von einer Template-DNA eine spezifische Nukleotidsequenz exponentiell vervielfältigt. Genomische DNA wurde hierfür aus

dem Blut gesunder Probanden unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits (Quiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Unter Verwendung der spezifischen CCR2, JAM-A oder JAM-L forward- bzw. reverse-Primer (siehe 7.6.3.1.) wird die genomische DNA in drei Schritten mittels PCR vervielfältigt:

Denaturierung	95°C
Annealing (je nach Primerbeschaffenheit)	55-72°C
Elongation (abhängig von DNA-Polymerase)	72-80°C

Der Reaktionsansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

10x Pfu Ultra II Reaction Buffer:	2,5 µL
dNTPs (25 mM je dNTP):	0,5 µL
Genomische DNA:	100 ng
Primer for (10 µM):	1,0 µL
Primer rev (10 µM):	1, 0 µL
Pfu Ultra II fusion HS DNA Polymerase:	1,0 µL
Nuklease-freies Wasser:	18,0 µL

Die Amplifikation erfolgte anschließend in 35 Zyklen nach initialer Hitzeaktivierung (10 Minuten, 95°C).

- 1) Denaturierung: 30 Sekunden, 95°C
- 2) Primer-Annealing: 20 Sekunden, (Primer-T_M) - 5°C
- 3) Elongation: 15 Sekunden, 72°C
- 4) Finale Elongation: 5 Minuten, 72°C

Die Hälfte des PCR-Produktes wurde mit 6x Ladepuffer gemischt und in einem 1%-igen Agarosegel bei 120V für 60 Minuten aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht detektiert und die Fragmentgröße mittels DNA-Molekulargewichtsmarker ermittelt. Die erwartete Fragmentgröße des CCR2 lag bei 840 bp, JAM-A bei 598 bp, JAM-L bei 557 bp.

3.3.1.2. Ligation in den Klonierungsvektor pSC-B-amp/kan

Die Ligation des PCR-Produktes erfolgte in den Topoisomerase-Klonierungsvektor pSC-B-amp/kan (StrataClone Ultra Blunt PCR Cloning Kit, Stratagene). 2 µL des entstandenen Amplifikats wurden zu 3 µL Strata Clone Blunt Cloning Buffer und 1 µL Strata Clone Blunt Vector Mix amp/kan gegeben, gut gemischt und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Amplikon wird in dieser Zeit in die beiden im Vector Mix enthaltenen DNA- Stränge durch Topoisomerase I, die an jeweils einem Ende der Stränge angehängt ist, in die beiden DNA-Arme ligiert. An dem jeweils anderen Ende der DNA-Stränge befinden sich loxP-Erkennungssequenzen, sodass das Produkt ein linearer Doppelstrang mit jeweils einer loxP-Erkennungssequenz am Ende ist, was bei der Transformation zum Tragen kommt.

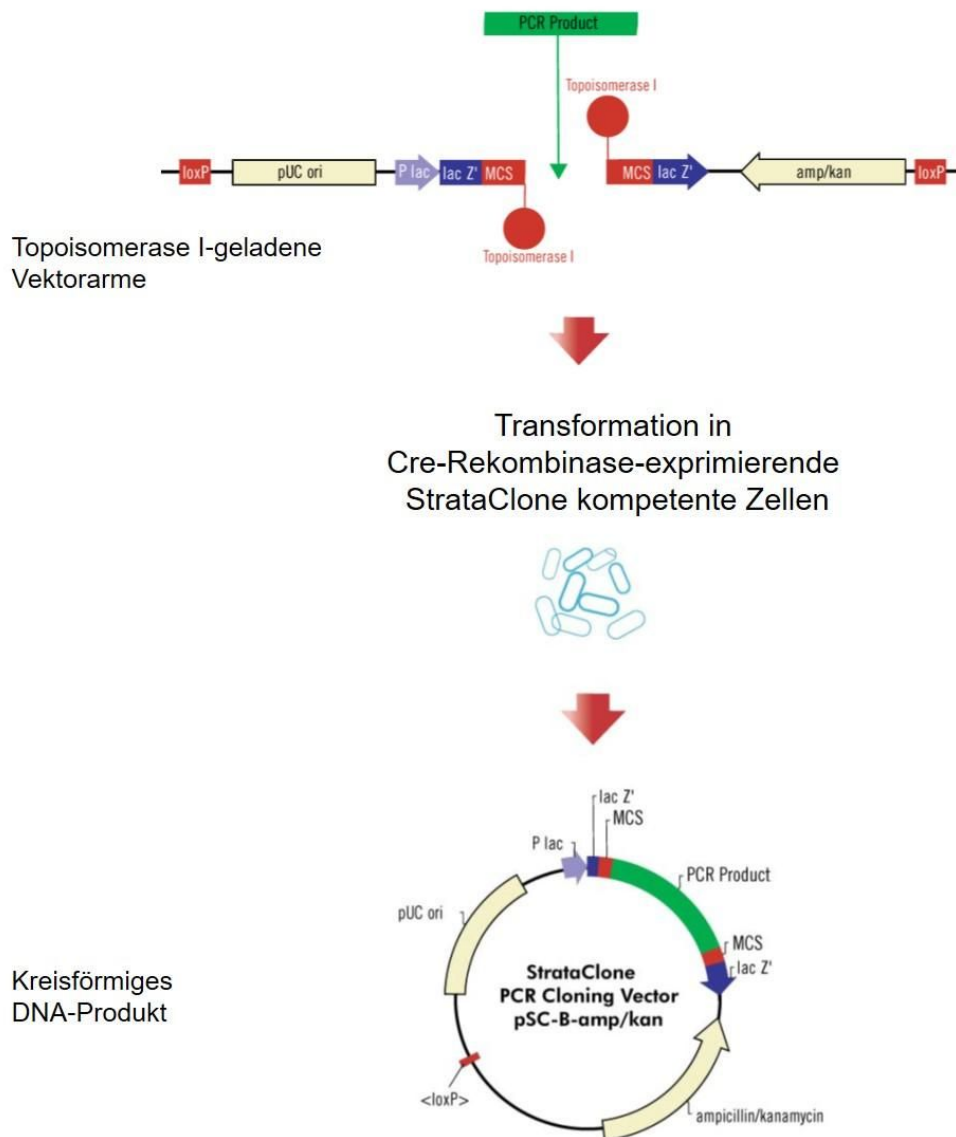


Abb. 6:

Ligation und Transformation des PCR-Produkts in den Klonierungsvektor pSC-B-amp/kan

Das PCR-Produkt wurde in die Topoisomerase I-geladenen Vektorarme mit *loxP*-Erkennungssequenz ligiert. Die Cre-Rekombinase der StrataClone kompetenten Zellen katalysiert die Rekombination der beiden *loxP*-Sequenzen, was zu einem kreisförmigen Vektor führt. Dieser enthält ein Ampicillin/Kanamycin-Resistenzgen, was den Zellen nach erfolgreicher Transformation ein Wachstum auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten ermöglicht.

Quelle: Agilent.com

3.3.1.3. Hitzeschocktransformation in kompetente E.coli Zellen

Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte mittels Hitzeschock in kompetente E.coli-Zellen (StrataClone SoloPack Competent Cells). Diese E.coli-Zellen enthalten eine Cre-Rekombinase, die die loxP-Enden erkennt und verknüpft, sodass das Molekül eine Ringform annimmt.

Hierzu wurden 50 µL der kompetenten E. coli auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit dem kompletten Ligationsansatz vermischt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock, indem der komplette Ansatz für 45 Sekunden in ein auf 42°C-geheiztes Wasserbad gehalten wird, um die E.coli für die Aufnahme der DNA zu permeabilisieren. Anschließend folgte eine 2-minütige Inkubation auf Eis, bevor 250 µL vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben wurde. Der gesamte Ansatz wurde nun für 60 Minuten in einem Schüttler (225 rpm) bei 37°C inkubiert, und anschließend auf LB-Agar-Platten, die mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt wurden, ausplattiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Durch ein Ampicillinresistenzgen auf dem Vektor war nur eine Vermehrung der Bakterien mit erfolgreicher Aufnahme des Plasmids auf den LB-Agar-Platten möglich.

Nach Aufbereitung gewachsener Kolonien erfolgte die Plasmidisolierung nach Protokoll mittels des QiaPrep Mini Kits (Qiagen).

3.3.1.4. Restriktionsverdau durch Endonukleasen

Der Restriktionsverdau der Plasmide erfolgte durch Restriktions-Endonukleasen, die DNA-Abschnitte sequenzspezifisch schneiden können.

Folgender Reaktionsansatz wurde für eine Stunde im Wasserbad bei 37°C verdaut:

NEB CutSmart Buffer	5 µL
Xho I (20 U/µL)	0,5 µL
Pme I (10 U/µL)	1 µL
DNA	1 µg
Nuklease-freies Wasser	ad 50,0 µL

Der Restriktionsverdau erfolgte in sämtlichen Fällen mittels der Restriktionsenzyme Xho I (20 U/µL) und Pme I (10 U/µL). Im gleichen Ansatz wurde 1 µg leerer psiCHECK-2 mit den Restriktionsenzymen verdaut, damit dieser die gleichen Schnittstellen aufweist wie das aus dem Topo-Vektor verdaute DNA-Produkt. Durch das Schnittmuster der Restriktionsenzyme entstehen 5' überhängende Basen, sogenannte "sticky ends", die eine erneute Ligation erleichtern.

Nach dem Restriktionsverdau erfolgte die Aufreinigung der ausgeschnittenen Produkte und die Auftrennung über ein präparatives Agarosegel, aus dem das gewünschte DNA-Fragment ausgeschnitten wurde. Anschließend folgte die Aufreinigung des DNA-Fragments aus dem Gel mittels Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega).

3.3.2. Klonierung der 3'UTR in den Expressionsvektor psiCHECK™-2

3.3.2.1. Ligation

Das geschnittene DNA-Fragment wurde anschließend in den gleichermaßen geschnittenen psiCHECK2 ligiert. Hierfür ergab sich folgender Reaktionsansatz:

T4 Ligase	1 µL
T4 Ligase Puffer	1 µL
Vektor : Insert	1 : 3 (Molare Ratio)

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und am folgenden Tag erneut in *E. coli* transformiert. Anschließend wurde die Transformation auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert, auf denen durch das Ampicillinresistenzgen im psiCHECK-2-Vektor nur erfolgreich mit dem Vektor transformierte Kolonien wachsen konnten.

Die Plasmide wurden mittels PureYield Plasmid Midiprep Systems von Promega isoliert und die korrekte Sequenz und Orientierung des 3'UTRs im Vektor mittels Sequenzierung (MWG, Ebersberg) nachgewiesen.

3.3.2.2. Gerichtete Mutagenese der miR-125a-Bindestellen

Um die putativen Bindestellen der miR-125a in der CCR2 3'UTR zu verifizieren, wurden diese sequentiell mit Hilfe des QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits und den unter 7.6.3.2. aufgeführten Mutagenese-Primern mutiert. Als Template diente die Plasmid-DNA (psiCHECK-2) mit dem gewünschten Insert.

Ein Reaktionsansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

Plasmid DNA	100 ng
Mutagenese Primer for (BS 1 bzw. 2)	0,5 µL
Mutagenese Primer rev (BS 1 bzw. 2)	0,5 µL
dNTP	1,0 µL
QuikSolution Reagenz	1,5 µL

QuikChange Lightning Enzym	1,0 µL
10x Reaktionspuffer	5 µL
Nuklease-freies Wasser	ad 50,0 µL

Die Amplifikation erfolgte im Mastercycler pro S (Eppendorf) nach einer initialen Denaturierung für 2 Minuten bei 95°C unter folgenden Reaktionsbedingungen:

- 1) Denaturierung: 20 Sekunden, 95°C
- 2) Primer Annealing: 10 Sekunden, 60°C
- 3) Elongation: 213 Sekunden, 68°C

Es folgte eine finale Elongation für 5 Minuten bei 68°C.

Zusätzlich zu der Mutation der einzelnen potenziellen Bindestellen wurde eine Doppelmutante generiert. Hierfür diente die Plasmid-DNA mit bereits erfolgreich mutierter erster Bindestelle als Template, der PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Plasmid DNA	100 ng
Mutagenese Primer for	0,5 µL
Mutagenese Primer rev	0,5 µL
dNTP	0,5 µL
QuikSolution Reagenz	0,75 µL
QuikChange Lightning Enzym	0,5 µL
10x Reaktionspuffer	2,5 µL
Nuklease-freies Wasser	ad 25,0 µL

Die Reaktionsbedingungen der Amplifikation im Mastercycler waren identisch zu denen der Einzelmутanten.

Sämtliche PCR-Produkte wurden anschließend für 15 Minuten bei 37°C mit 2 µL DpnI, einer Restriktions-Endonuklease, behandelt. Diese dient der Identifizierung und Fragmentierung noch vorhandener nicht-methylierter, parenteraler DNA. Somit wird sichergestellt, dass nur noch Plasmide mit mutierter Bindestelle im Reaktionsansatz sind, da diese durch die Dam-Methylase der E. coli methyliert wird. Die PCR-Produkte wurden nun wiederum mittels Hitzeschocktransformation (siehe 3.3.1.3.) in XL 10-Gold UltraCompetent Cells eingebracht und nach Plasmidisolation zur Bestätigung der Mutation sequenziert.

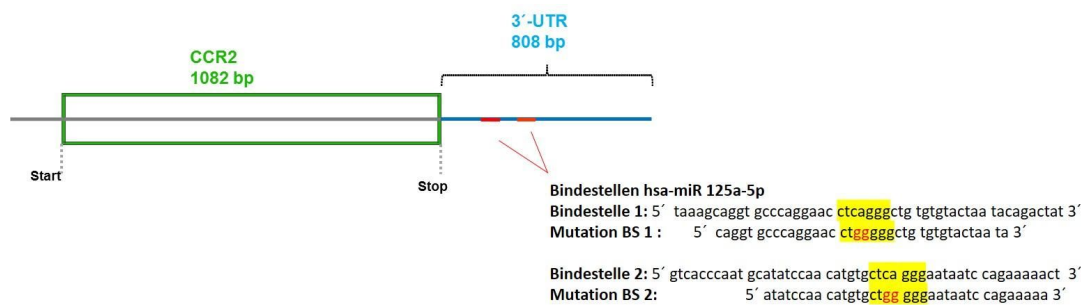


Abb. 7:

Bindestellen der miR-125a in der CCR2 3'UTR und deren Mutationen

3.3.3. Plasmidpräparation und DNA-Sequenzierung

3.3.3.1. Minipräparation und Midipräparation

Die Plasmidisolierungen aus E. coli erfolgten abhängig von der benötigten DNA-Ausbeute mittels des PeqGold Plasmid Miniprep Kit I (für kleinere Ausbeute) oder des Pure Yield™ Plasmid Midiprep Systems (Promega).

Beide Systeme kombinieren eine alkalische Lyse mit den DNA-Adsorptionseigenschaften einer Silica-Membran, wobei die Ausgangsmenge der bakterienhaltigen LB-Suspension unterschiedlich ist. Hierfür werden für die Mini-Präparation 3 mL des LB-Mediums mit einzeln gepickten Bakterienkolonien benötigt, im Falle der Midi-Präparation werden 100 mL LB-Medium verwendet. Das LB-Medium wird mit 100 $\mu\text{g/mL}$ Ampicillin supplementiert, um ein unspezifisches Bakterienwachstum zu verhindern. Nach einer 12-stündigen Inkubation unter ständigem Schütteln (225 rpm, 37°C) wird die Plasmidisolierung entsprechend des jeweiligen Protokolls durchgeführt, sodass am Ende ein klarer Überstand entsteht, der die Plasmid-DNA enthält. Nach Bindung der DNA an die Säulenmatrix wird diese mit Puffern gewaschen und mit Nuklease-freiem Wasser eluiert.

3.3.3.2. DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der isolierten DNA wurde durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) vorgenommen. Dafür wurden 15 μL des Eluats der zu untersuchenden DNA auf eine Konzentration von 6 $\text{ng}/\mu\text{L}$ eingestellt und mit dem psi-CHECK-2-Vektor Sequenzierungsprimer (Konzentration: 2 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ in 15 μL) eingeschickt. Das Ergebnis wurde mit Hilfe des PubMed BLAST-Algorithmus auf Übereinstimmung mit der Zielsequenz kontrolliert.

3.4. Transiente Transfektion

3.4.1. Transiente Transfektion primärer humaner Monozyten

Die Transfektion der primären humanen Monozyten erfolgte in 100 μL -Transfektionsspitzen. Für anschließende Untersuchungen wurde die für den Versuch vorgesehene (siehe Tabelle 2) Anzahl Monozyten in Neon-Resuspensionspuffer T gelöst und mit 50 nM einer chemisch modifizierten reifen miR-125a-5p (folgend: prä-miR-125a genannt), bzw. anti-CCR2-siRNA in

Triplikaten transfiziert. Als Kontrolle wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen eine Kontroll-prä-miR bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Die Elektroporation erfolgte einmalig für 30 msec bei 1900 Volt. Anschließend wurden die transfizierten Monozyten in vorgewärmtes RPMI 1640-Kulturmedium ohne Antibiose überführt und im Inkubator (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet prozessiert.

Tabelle 2: Versuchsbedingungen transfizierter primärer humaner Monozyten				
Methode	Zellzahl Monozyten	Mediumvolumen	Zellkulturschale	Inkubation
qPCR	3 x 10 ⁶ Triplikate	1900 µL	6-Well	17 Stunden
Western Blot	5 x 10 ⁶ Triplikate (Gepoolt)	1900µL	6-Well	20 Stunden
Chemotaxis	1 x 10 ⁶ Triplikate (Gepoolt)	900 µL	12-Well	20 Stunden
Adhäsionsversuche	5 x 10 ⁶ Triplikate (Gepoolt)	1900µL	6-Well	20 Stunden

3.4.2. Transiente Kotransfektion von HEK-293-Zellen

Für die Durchführung eines dualen Luciferase-Reporter-Gen-Assays wurden HEK-293-Zellen transfiziert. Dafür wurden 1×10^5 Zellen pro Ansatz in Neon-Resuspensionspuffer R resuspendiert und mit 1 µg psiCHECK-2-Reporterplasmid-DNA mit dem klonierten CCR2 3'UTR (als Wildtyp bzw. in mutierter Form) und 50 nM prä-miR-125a bzw. prä-miR-Negative Control co-transfiziert. Dies erfolgte in einer 10 µL-Transfektionsspitze bei 1150 Volt (20 msec, 2 Impulse). Nach 40 Stunden Inkubation in DMEM-Medium ohne Antibiose wurden die Zellen geerntet.

3.4.3. Dualer Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Zur Ermittlung der Luciferase-Reporter-Gen-Aktivität der transient co-transfizierten HEK-293-Zellen wurde das Dual-Glo Luciferase Assay System verwendet.

40 Stunden nach der Transfektion der HEK-293-Zellen wurden diese geerntet und in 20 µL DMEM-Medium resuspendiert.

Zur Bestimmung der Aktivität der Reportergene Firefly- und Renilla-Luciferase wurden 15 µL der Zellsuspension zunächst in eine 96-Well-Platte überführt und mit 15 µL Dual-Glo Reagent versetzt. In einer 10-minütigen Inkubationszeit lysiert dieses die Zellen und aktiviert durch das enthaltene Substrat die Firefly-Luciferase, welche die Kontrollluciferase darstellt. Die Lumineszenz wurde am ELISA Reader quantifiziert. Anschließend wurden die Proben mit 15 µL Dual-Glo Stop and Glo Reagent, welches das Substrat für die Renilla-Luciferase enthält, versetzt und dabei das Signal der Firefly-Luciferase vollständig reduziert. Die Lumineszenz der Renilla-Luciferase wurde ebenfalls gemessen und die relative Luciferaseaktivität ermittelt. Dafür wurde die Renilla-Luciferaseaktivität, die abhängig von der Regulation durch miR-125a nur bei nicht-degradierter CCR2-mRNA messbar ist, auf die

Firefly-Luciferaseaktivität, die konstant exprimiert wird, normalisiert. Dieses ermittelte Verhältnis ist ein Maß für die Regulation der CCR2-mRNA durch miR-125a.

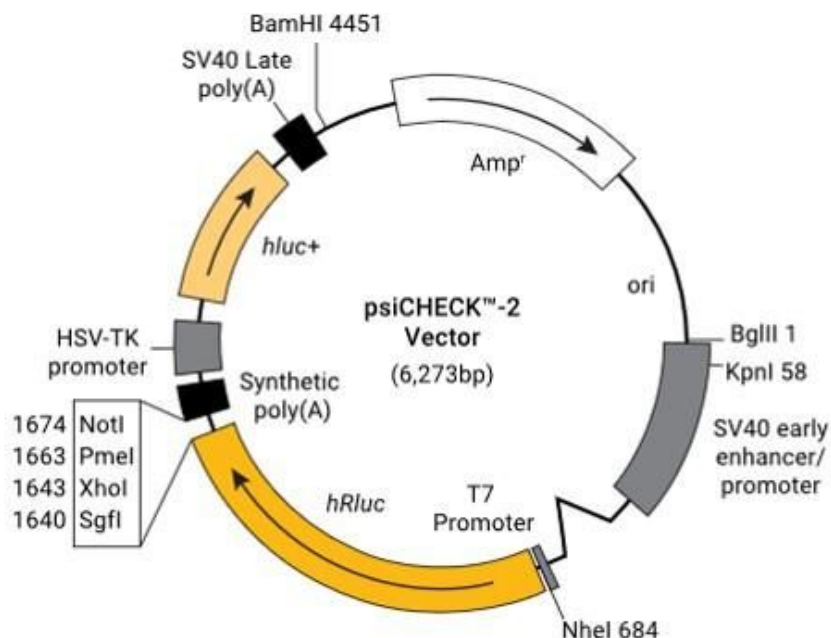


Abb. 8:

psiCHECK™-2-Vektor

Die Aktivität der Renilla-Reporter-Luciferase (hRluc) ist abhängig von der Regulation der CCR2-mRNA durch miR-125a messbar. Die Firefly-Luciferase (hLuc+) wird konstant exprimiert und dient als interne Kontrolle. Das Verhältnis der Renilla-Luciferase-Aktivität zur Firefly-Luciferase-Aktivität ist somit ein Maß für die Regulation der CCR2-Expression durch miR-125a.

Quelle: Promega GmbH

3.4.4. Durchflusszytometrische Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden primäre humane Monozyten mit einer fluoreszenzmarkierten prä-miR transfiziert. Hierfür wurden 2×10^6 Monozyten mit 50 nM Cy3 dye-labeled prä-microRNA Negative Control (Applied Biosystems) nach Standardprotokoll transfiziert und 20 Stunden inkubiert. Für die Messung wurden die Zellen geerntet und

zweimal mit HBSS gewaschen, bevor sie in 1 mL PBS resuspendiert und am Attune Acoustic Focusing Cytometer gemessen wurden. Als Vergleichskontrollen dienten nicht transfizierte Monozyten derselben Probanden.

Die Erfassung des Fluoreszenzsignals erfolgte im Fluoreszenzkanal BL-2 nach Anregung des Cy3-Fluorochroms durch den Laser bei 488 nm und einem 575 nm/24 nm Emissionsfilter.

Die Auswertung erfolgte durch die Attune Cytometric Software Version 1.2 (Applied Biosystems).

3.5. Proteinbiochemische Methoden

3.5.1. Gewinnung von Zytosol- und Membranprotein und Proteinbestimmung

Proteine wurden mit Hilfe des Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kits (Thermo Fisher) gewonnen und dabei in eine zytosolische Proteinfraction und Membranproteine aufgeteilt.

Zunächst wurden die mit einer Kontroll-prä-miR bzw. prä-miR-125a transfizierten Monozyten für 30 Minuten mit CCL2 (25 ng/mL) stimuliert und anschließend geerntet. Nach zweimaligem Waschen mit 2 mL Cell Wash Solution, wobei die Ansätze in Triplikaten gepoolt wurden (insgesamt 15×10^6 Monozyten pro NC bzw. prä-microRNA), folgte die Permeabilisierung der Zellen mit 250 µL Permeabilization Buffer mit Protease Inhibitor Cocktail. Nach einer 10-minütigen Inkubation unter ständigem Schütteln bei 4 °C wurde die Zell-Detergens-Suspension in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge für 15 Minuten bei 16000 x g zentrifugiert. In dem Überstand befinden sich sodann die löslichen Zytosolproteine, welche in ein neues 500 µL steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurden. Das bei der Zentrifugation entstandene Pellet wird in 180 µL Solubilization Buffer mit Protease-Inhibitor

Cocktail aufgenommen und resuspendiert, um anschließend für weitere 30 Minuten bei 4°C geschüttelt zu werden. Nach einer weiteren Zentrifugation (16000 x g, 15 Minuten, 4°C) wurde der erhaltene Überstand mit den integralen Membranproteinen in ein 500 µL steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Die Bestimmung der erhaltenen Proteinfractionen erfolgte mittels Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), welchem die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in alkalischem Milieu zugrunde liegt (Biuret-Reaktion). Bicinchoninsäure reagiert mit den entstandenen einwertigen Kupferionen zu einer Komplexverbindung, welche colorimetrisch detektiert werden kann. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit Hilfe einer BSA-Standardgeraden (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0 mg/mL).

Es wurde zunächst Reagenz A (enthält Bicinchoninsäure) mit Reagenz B (enthält Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1 gemischt. Anschließend legt man 10 µL BSA-Standard bzw. Probe in einer 96-Well ELISA-Platte vor und gibt 200 µL des BCA/Kupfergemisches dazu. Die ELISA-Platte wird sodann dunkel bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, bevor man die Proteinkonzentration in den Proben bei 562 nm bestimmt.

3.5.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE erfolgt die Trennung der Proteine in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer Molekularmasse. Dafür wurden die extrahierten Proteinproben zunächst mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95°C denaturiert. SDS hat als anionisches Detergens die Eigenschaft, die formgebenden hydrophoben Bereiche, die für die Sekundär- und Tertiärstruktur verantwortlich sind, innerhalb der Proteine aufzulösen und diese somit zu linearisieren. Gleichzeitig überdeckt es durch seine stark negative Ladung die Eigenladung der Proteine und baut eine konstant negative Ladung auf, die sich proportional zur Größe des jeweiligen Proteins verhält.

Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen, wo sie nach Anlegen eines elektrischen Feldes zunächst ein 6%-iges Sammelgel durchwandern, welches die Proteine fokussiert. Anschließend wandern die Proteine in ein 14%-iges Trenngel ein, wo die Trennung nach ihrem Molekulargewicht erfolgte.

Als interne Größenkontrolle wurde eine PageRuler Prestained Protein Ladder (10-230 kDa) mit aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer bei 100 V pro Gel über zwei Stunden. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde sodann für den Western-Blot verwendet.

3.5.3. Western Blot

Der Transfer der Proteine aus dem Gel erfolgte je nach Empfindlichkeit des zu untersuchenden Proteins mittels eines Wet-Blots (Mini Protean II Blotting Kammer), bei empfindlichen Proteinen, oder eines Semi-Dry-Blots (Trans-Blot Turbo Transfer System), in jedem Fall auf eine PVDF-Membran. Im Falle des Wet-Blots wurde die Membran zunächst 3 Minuten in Methanol aktiviert. Dann wurde diese, ebenso wie die Schwämme, das Filterpapier und das Gel in 1x Transferpuffer (Transferpuffer + 20% Methanol) äquilibriert und nach dem Sandwichverfahren in einer Kassette aufgebaut. Die Gelkassette wurde in die Blotting-Apparatur gesetzt, welche daraufhin mit 1x Transferpuffer gefüllt und bei 100 V für eine Stunde unter Kühlung geblottet wurde.

Im Falle eines Turbo-Blots wurde die Membran ebenfalls in Methanol aktiviert und anschließend in 1x Transferpuffer äquilibriert. Filterpapier und Membran waren schon getränkt in Transferpuffer abgepackt in den Trans Blot Turbo Mini PVDF Transfer Packs, sodass diese und das Gel in der Kassette geschichtet werden konnten und bei 1,3 A (25 V) für 10 Minuten geblottet wurden. Die Membran wurde nach dem Blot für eine Minute in Methanol inkubiert.

Optional wurde als Proteinnachweis eine reversible Ponceau S-Färbung durchgeführt.

Um unspezifische Proteinbindestellen abzublocken wurde die Membran anschließend für eine Stunde in Blockpuffer (5% Magermilch oder BSA in TBS-T) inkubiert. Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 4°C mit den Primärantikörpern (s. 7.6.1.) in 4 mL TBS-T versetzt.

Nach 16 Stunden wurde die Membran dreimal in TBS-T + 1% Magermilch oder BSA für 10 Minuten gewaschen, sodann erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper, dem sich wiederum dreimaliges Waschen mit TBS-T anschloss.

Die Detektion erfolgt mit Hilfe des SignalFire ECL Reagent. Die enthaltenen 2x Reagenz A und 2x Reagenz B wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermengt und die Membran darin inkubiert. Die Reagenzien enthalten unter anderem das Substrat der Meerrettichperoxidase, die an die Sekundärantikörper gekoppelt ist, woraufhin eine Chemilumineszenz detektiert werden kann. Proteine wurden mit Hilfe einer digitalen CCD Kamera aufgenommen und über die Kopplung mit einem Computer anhand der Wasabi Imaging Software (Version 1.5, Stand 03/2006, Hamamatsu Photonics) dargestellt. Die Intensität der erhaltenen Banden wurden mit Hilfe von ImageJ quantifiziert.

3.6. Durchflusszytometrische Bestimmungen

Für durchflusszytometrische Bestimmungen wurden PBMC oder Monozyten in 5 mL-Röhrchen geerntet, 2 mL HBSS dazugegeben und zentrifugiert (5 Minuten, 400 x g). Das Zellpellet wurde in 2 mL FACS-Puffer (PBS + 1% BSA + 0,1% Natriumazid) resuspendiert und erneut 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und das Pellet in 100 µL FACS-Puffer aufgenommen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an Fc-Rezeptoren zu verhindern, wurde zunächst ein Fc-Rezeptor Block durchgeführt. Dafür wurden 5 µL der Human TruStain FcX-Lösung in die

Zellsuspension pipettiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2 µL der Antikörper (siehe 7.6.2.) zu der Suspension gegeben.

Nach einer 30-minütigen Inkubation lichtgeschützt auf Eis wurden die Proben 3 x mit PBS-FACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper aus der Suspension zu entfernen. Die Zentrifuge wurde hierfür auf 4°C gekühlt. Nach Zentrifugation des letzten Waschschruttes wurde das Zellpellet in 1 mL PBS-FACS-Puffer aufgenommen und die Fluoreszenzsignale am Attune Acoustic Focusing Cytometer gemessen. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit einer Isotypenkontrolle gefärbt, die unspezifische Bindungen des Primärantikörpers aufzeigt

3.7. Microarray

Es wurde eine Expressionsanalyse des gesamten Transkriptoms transfizierter Monozyten mittels Affymetrix GeneChip® Prime View™ Human Gene Expression Array (IMG M Laboratories GmbH, Martinsried) durchgeführt. Hierzu wurden 3×10^6 Monozyten mit prä-miR-125a- bzw. prä-miR-NC transfiziert und 17 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und für das Microarray zu IMG M Laboratories GmbH in Martinsried transportiert.

Dort wird die gereinigte und amplifizierte RNA mittels Biotin markiert und anschließend in der Hybridisierungsphase an Nukleinsäuren von Genen mit bekannter Sequenz, welche sich auf einer Immobilisierungsmatrix befinden, gebunden. Nach dem Abwaschen unspezifisch gebundener Nukleinsäuren werden die gebundenen markierten Nukleinsäuren über einen Fluoreszenzscanner durch den Ort der Hybridisierung auf dem Chip identifiziert und über das Verhältnis der Fluoreszenzintensität quantifiziert. Diese Rohdaten wurden mit Hilfe der Statistik-Software R, Version 3.2.4, und der Bibliothek Bioconductor prozessiert ⁵⁶. Entsprechend der Publikation von Irizarry et al. (2003) wurden die Daten mittels der Robust

Multi-Array Average-Funktion hintergrundkorrigiert und normalisiert, um mögliche Fehlinterpretation durch systemischen Bias zu reduzieren ⁵⁷. Die statistische Bewertung der Expressionsunterschiede wurde mit der eBayes-Funktion durchgeführt und mittels Benjamini-Hochberg Algorithmus für multiple Hypothesentestung korrigiert. Differenziell regulierte Gene wurden einer Pathway-Analyse durch KEGG und STRING unterzogen.

3.8. Chemotaktische Studien

3.8.1. Boyden-Kammer Migrationsassay

Die Boyden-Kammer besteht aus zwei Kompartimenten, welche durch eine 5µm-porige semipermeable PET-Membran (Greiner BioOne Thincert™) getrennt werden. Die Größe der Poren wurde entsprechend gewählt, um eine aktive Migration zu gewährleisten und eine passive Diffusion zu verhindern. Das untere Kompartiment (12-Well-Gewebekulturplatte) wurde mit 600 µL RPMI mit 50 ng/mL CCL2 befüllt, wobei durch die Poren der Membran ein Konzentrationsgefälle entsteht, welches die Migration der Monozyten zu dem Chemokin veranlasst. Acht Stunden nach Transfektion der prä-miR-125a bzw. einer Negativkontrolle wurden eine Million viable transfizierte Zellen in 100 µL RPMI aufgenommen und die Zellsuspension in das obere Kompartiment überführt. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Migrierte Monozyten aus dem unteren Kompartiment wurde geerntet und zentrifugiert (500 x g, 5 Minuten), um anschließend in 1 mL PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch quantifiziert zu werden.

Greiner Bio-One Thincert™

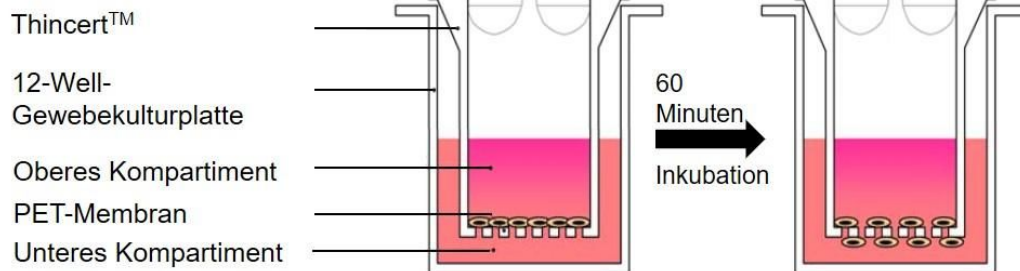


Abb. 9:

Chemotaktische Studien mittels Boyden-Kammer

In das obere Kompartiment der Boyden-Kammer wurden die transfizierten Monozyten pipettiert, in das untere Kompartiment wurde CCL2 als Lockstoff gegeben. Durch den Aufbau eines Konzentrationsgefälles wurden die Monozyten zur Migration veranlasst.

Quelle: modifiziert nach Greiner Bio-One GmbH

3.8.2. Chemotaxis^{3D}-Assay mit Echtzeit-mikroskopischer Auswertung

Das Chemotaxisverhalten der transfizierten Monozyten wurde Echtzeitmikroskopisch mit Hilfe des Axio Observer Z1 (Carl Zeiss GmbH, Jena) in einer Chemotaxis^{3D} μ -Slide (ibidi, Martinsried) untersucht. Die Chemotaxis-Slides bestehen aus zwei großen Reservoirs (Füllvolumen 65 μ L), welche durch einen schmalen Kanal (Observationsareal) mit semipermeablen Membranen getrennt sind. Die Reservoirs werden mit Zellkulturmedium bzw. Zellkulturmedium + Chemokin (hier: RPMI+20% FCS, Chemokin: CCL2) gefüllt, in den schmalen Kanal werden die Zellen in einer 3D-Matrix (Collagengel) gegossen. Dieser

Aufbau führt dazu, dass sich in dem Gel ein linearer Gradient des Lockstoffes aufbaut, der mindestens 48 Stunden stabil bleibt.

RPMI+20% FCS und die Chemotaxis^{3D} μ -Slide (ibiTreat) wurden zur Entgasung und Äquilibration über 24 Stunden im Inkubator inkubiert.

20 Stunden nach Transfektion der Monozyten (NC, prä-miR-125a und siCCR2) bzw. nach Stimulation mit 0,5 ng/mL LPS wurden diese geerntet (500 x g, 5 Minuten) und gezählt. 2 Millionen Monozyten wurden in 25 μ L entgastem RPMI resuspendiert. Der pH-Wert von 21 μ L bovinem Collagen (siehe 9.4. Gele) und 153 μ L RPMI wurde mittels 4 μ L NaHCO₃ und 1 μ L Natronlauge auf einen neutralen pH von 7,0 eingestellt und die Zellsuspension gleichmäßig in der Matrix resuspendiert. 6 μ L der entstandenen Suspension wurde in den Kanal pipettiert und dieser mit Plugs verschlossen. Die Slide wurde in eine Petrischale mit feuchten Tüchern gesetzt und zum Ausgelieren eine Stunde im Inkubator inkubiert. Unmittelbar vor der mikroskopischen Aufnahme wurden die Reservoirs gefüllt (65 μ L RPMI versus RPMI + 50 ng/mL CCL2) und die Monozyten so einem chemotaktischen Gradienten ausgesetzt.

Das Migrations-Mikroskop Axio Observer Z1 wurde mit einem Life Cell Imaging System von Ibidi ausgestattet. Ein eigenes Heiz- und Gasmischsystem sorgte dafür, dass kontrollierte Zellkulturbedingungen vorherrschten (37°C, 5% CO₂).

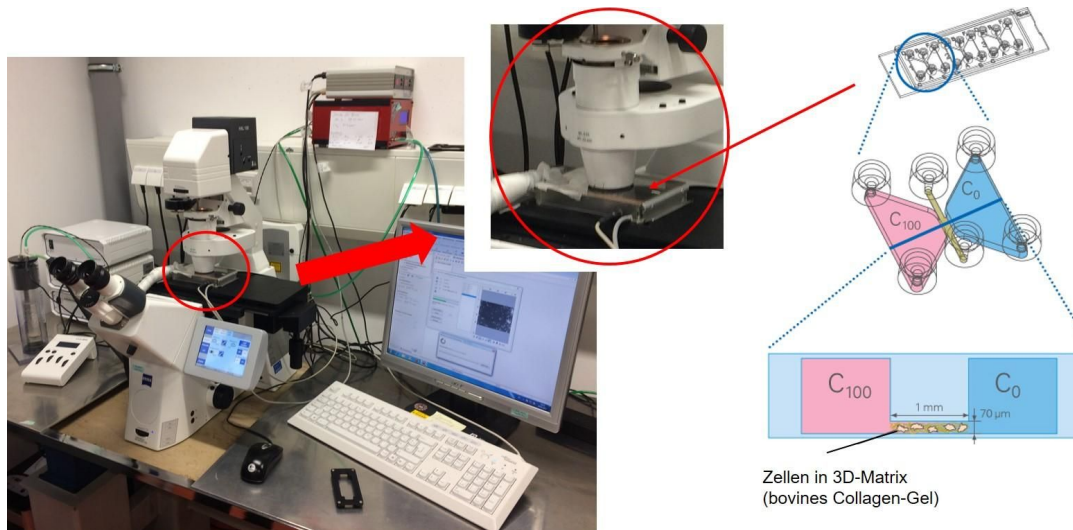


Abb. 10:

Chemotaktische Studien mittels Chemotaxis^{3D}-Assay

Transfizierte Monozyten wurden in eine 3D-Matrix gegossen und einem konstanten chemotaktischen Gradienten ausgesetzt. Das Echtzeit-Mikroskop wurde mit einem Life Cell Imaging System ausgestattet, welches mit einem eigenen Heiz- und Gasmischsystem für Zellkulturbedingungen sorgte.

Quelle: modifiziert nach ibidi GmbH

Es wurden pro Kanal drei Positionen ausgewählt, die vom Mikroskop, angeschlossen an einen Computer mit AxioVision Software (Zeiss), alle 60 Sekunden über vier Stunden fotografiert wurden.

Die Auswertung der Bilder erfolgte zunächst mit Hilfe des Image J Plugins "Manual tracking". Die erfassten Zellbewegungen wurden anschließend durch ein freies, von Ibidi zur Verfügung gestelltes ImageJ Plugin, dem Chemotaxis and Migration Tool, analysiert. Dieses rechnet die Zellbewegung von Pixelwerten in Streckenangaben (μm) um und überträgt sie in ein Koordinatensystem, wobei jede Zellbewegung auf den Koordinatenursprung $(x;y)=(0;0)$ zum Zeitpunkt $t=0$ normiert wird. So werden verschiedene Parameter ermittelt: das Center of

Mass (COM) beschreibt den durchschnittlichen Punkt (Schwerpunkt) aller Zellendpunkte; der x-Forward Migration Index bzw. y-FMI, der die Effizienz der Bewegung in Relation zur x- bzw. y-Achse aufzeigt; die Netto-und Gesamtdistanz jeder einzelnen Zelle; die Direktheit der Zellbewegung zum Chemotaxin (Nettodistanz/Gesamtdistanz) und die Zellgeschwindigkeit.

3.9. Adhäsionsstudien

3.9.1. Isolierung von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)

Für die Isolation von Endothelzellen aus der humanen Nabelvene (Vena umbilicalis) wurden frische Nabelschnüre aus der geburtshilflichen Abteilung des LMU Klinikums der Universität München in Großhadern verwendet. Nach der Einwilligung der Spender nach erfolgter Aufklärung wurde die Nabelschnur in einen mit 50 mL sterilem PBS mit Antibiose (1% Penicillin/Streptomycin) gefüllten Messbecher gegeben und sofort weiterprozessiert.

Durch Ausstreichen der Nabelschnur wurden zunächst überschüssiges Blut entfernt. Anschließend wurde an beide Enden etwa 1 cm Gewebe abgeschnitten, um die beiden Nabelarterien und die Nabelvene deutlich sichtbar zu machen. In diese wurde beidseitig eine Knopfkanüle in die Vene eingeführt und fixiert, auf welche ein 3-Wege-Hahn-Verschlusssystem angebracht wurde. Um die Nabelvene von Blutbestandteilen zu reinigen und Koagulationen zu lösen wurden 10 mL 37°C warmes PBS mittels 20 mL-Spritze über das obere System durch die Nabelvene gespült.

Sobald am unteren Ende klares PBS austrat, wurden 10 mL 1% Collagenase A in Hank'scher Lösung (Roche) in die Vene gegeben, die 3-Wege-Hähne verschlossen, und die Nabelschnur in einer Petri-Schale für 10 Minuten im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Um die abgelösten Endothelzellen zu gewinnen, wurde über den oberen Dreiwegehahn 10 mL DMEM zum Waschen gegeben, während der untere Dreiwegehahn geöffnet und die

austretende Flüssigkeit in einem 50 mL Falcon aufgefangen wurde. Sich noch in der Nabelschnur befindende, nicht vollständig abgelöste HUVEC wurden durch mehrmaliges Waschen und Auffangen von DMEM gewonnen. Die Zellsuspension wurde sodann zentrifugiert (300 x g, 5 Minuten), der Überstand abgenommen und die HUVECs in Endothelial Cell Growth Medium +10% FCS aufgenommen und ausplattiert.

3.9.2. μ -Slide I-Coating

Für optimale Wachstumsverhältnisse wurde die μ -Slide I (ibidi, Martinsried) gecoatet. Dafür wurde zunächst 120 μ L Poly-L-Lysin (0,05 mg/mL in PBS) in den Kanal pipettiert und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Slide 3x mit PBS gewaschen. Vor einer weiteren 15-minütigen Inkubation wurden 120 μ L Glutaraldehyd hinzugefügt. Es folgte dreimaliges Waschen, dann wurde 120 μ L 0,2%-ige Gelatine hineinpipettiert. Nach 10 Minuten folgten erneut die Waschgänge, bevor 120 μ L Endothelzellmedium (ECGM) in das Slide gefüllt wurde und über Nacht im Inkubator inkubiert wurde (37 °C, CO₂ 5%). Bevor die Slide mit Zellen gefüllt wurde, folgte ein einmaliges Waschen mit PBS.

3.9.3. Monozytenadhäsion unter Flussbedingungen

3.9.3.1. Aktivierung der Monozyten und Färbung mittels Calcein

6 Millionen Monozyten in Triplikaten wurden für Shear Stress Versuche 24 Stunden vor Perfusion über HUVECs transient mit prä-miR-125a bzw. einer Kontrolle oder siCCR2 bzw. einer si-Kontrolle transfiziert. Nach 20 Stunden erfolgte eine 45-minütige Aktivierung mittels 25 ng/mL CCL2, um endothelial gebundenes CCL2 eines inflammatorischen Endothels zu simulieren, und eine Fluoreszenzlebendfärbung mit 1 μ M Calcein-AM, um viable Monozyten zu erfassen. Anschließend wurden die Monozyten jeder Gruppe zusammengeführt und zentrifugiert (500 x g, 5 Minuten). Das Zellpellet wurde in 1 mL RPMI+20% FCS

resuspendiert, hiervon wurde an entsprechender Stelle des Versuchs je 500 μL in die Reservoirs der jeweiligen Fluidic Unit gegeben.

3.9.3.2. Scherbeanspruchung mittels ibidi Fluidic Pumpensystem

Die Versuche unter Flussbedingungen erfolgten in einer zuvor mit Gelatine beschichteten $\mu\text{-Slide I}^{0.6}$ Luer (ibiTreat, ibidi, Martinsried) und einem ibidi Fluidic Pumpen System.

Nach dem Ernten der frischen HUVEC bzw. HUVEC bis maximal Passage 4 wurden 150 μL der Zellsuspension (1 Million HUVECs pro mL) in den Slide gegossen. Der Ansatz wurde 3 Stunden im Inkubator (37°C , 5% CO_2) bis zur Adhärenz der HUVEC inkubiert und anschließend an das Fluidic System angeschlossen. Es erfolgte zunächst eine Perfusion mit 3 dyn/cm^2 , die nach 3 Stunden auf 5 dyn/cm^2 erhöht wurde. Nach weiteren 12 Stunden wurden die HUVEC für 6 Stunden mit 2,5 ng/mL $\text{TNF}\alpha$ aktiviert. Anschließend wurden die stimulierten HUVECs von der Fluidic Unit mit $\text{TNF}\alpha$ -ECGM-gefüllten Reservoirs abgeklemmt und an zwei neue Fluidic Units mit frischem ECGM in den Reservoirs angeschlossen.

Die transfizierten Monozyten wurden in das jeweils dazugehörige Pumpensystem eingefüllt (NC vs prä-miR-125a bzw. siNC vs siCCR2).

Die Monozyten wurden 45 Minuten bei 5 dyn/cm^2 über die HUVECs gepumpt, welches den Flussbedingungen eines Gefäßes in der frühen Phase der Inflammation entspricht (noch keine Vasodilatation). Anschließend wurde die Perfusion für 5 Minuten auf 10 dyn/cm^2 und nochmals für 10 Minuten auf 20 dyn/cm^2 erhöht, um nicht adhärenente Monozyten von dem Endothel zu waschen.

Nach insgesamt einer Stunde wurden die Slides von dem Pumpensystem getrennt und jeweils 6 x mit 150 μL PBS gewaschen. Anschließend wurde je eine lichtmikroskopische

sowie eine fluoreszenzmikroskopische (Excitation: 485 nm, Emmission: 535 nm) Aufnahme gemacht. Diese wurden sodann mit Hilfe von Image J übereinandergelegt und ausgewertet.

3.9.4. Calceinassay

Für das sich unmittelbar anschließende Calceinassay wurden die Slides 6 x mit Trypsin gewaschen, das einem zweimaligen vollständigem Flüssigkeitswechsel im Kanal entspricht. Nach dem letzten Waschgang schloss sich eine einminütige Inkubation im Inkubator (37°C, 5% CO₂) an. Um die abgelösten Zellen aus dem Slide zu ernten, wurde erneut 6 x mit PBS gewaschen. Sämtliche PBS- und Trypsin- Waschreste aus dem Slide wurden in einem 15 mL-Mikroröhrchen gesammelt, anschließend zentrifugiert (500 x g, 6 Minuten) und in 500 µL PBS resuspendiert. In einer schwarzen 96-well Platte wurden je 200 µL als Duplikate aufgetragen, als Kontrolle diente PBS (200 µL als Duplikate). Die Fluoreszenz von Calcein wurde am ELISA-Reader quantifiziert (Excitation: 485 nm, Emmission: 535 nm) und die Fluoreszenzintensitäten wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt.

3.10. Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels SigmaPlot 12.5. Bei Normalverteilung der Daten wurde der T-Test, ansonsten der Mann-Whitney U-Test angewendet. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde bei einem $p < 0,05$ festgelegt. Die Wiederholungen der Versuche sind als n angegeben, es wurden mindestens Triplikate durchgeführt.

Die in silico Identifizierung potenzieller miRNA-Bindestellen erfolgte mit Hilfe des Vorhersageprogrammes TargetScan.

4. Ergebnisse

4.1. In silico-Analyse und in vitro-Validierung identifizieren den CCR2 als potenzielles Zielgen der miR-125a auf humanen Monozyten

Zur Bearbeitung der Fragestellung sollte zunächst untersucht werden, ob Chemokinrezeptoren einer epigenetischen Regulation durch miRNAs unterliegen. Diese Fragestellung wurde anhand des für die Migration von Monozyten zentralen Rezeptors CCR2 bearbeitet. Als Grundlage dafür wurde die Expressionsstärke des Rezeptors auf THP-1 und auf frisch isolierten humanen Pan-Monozyten bestimmt. Eine CCR2-mRNA-Expressionsanalyse zeigte eine deutliche Expression des Rezeptors bei einem mittleren Cp-Wert von $22 \pm 0,1$ auf THP-1 bzw. $24 \pm 0,5$ auf Pan-Monozyten ($n=3$). Um zu untersuchen, ob miRNAs an der Regulation des CCR2 beteiligt sein könnten, verwendeten wir die miRNA-Online-Datenbank TargetScan, welche die 3'UTR des CCR2 auf komplementäre Bereiche zur Seed Region der miRNAs untersucht. MiR-125a wurde dabei als potentiell regulierende miRNA mit zwei putativen Bindestellen im konservierten Bereich der CCR2 3'UTR identifiziert.

Tab. 3:

In silico-Identifizierung von zwei Bindestellen in der CCR2 3'UTR (TargetScan), die Berechnung des Scores der Bindungswahrscheinlichkeit erfolgt nach Garcia et al, 2011⁵⁸

Position	Predicted consequential pairing	Score der Bindungswahrscheinlichkeit
	Target region: top miRNA: bottom	
Position 113-119 of CCR2 3' UTR	5' ...CAGGUGCCCAGGAAC CUCAGGG C... 3' AGUGUCCAAUUUCCCA GAGUCC U	-0.19
Position 169-176 of CCR2 3' UTR	5' ...CAUAUCCAACAUGUG CUCAGGGA ... 3' AGUGUCCAAUUUCCCA GAGUCC U	-0.39

Zur experimentellen Validierung einer potenziellen Interaktion von miRNA und 3'UTR wurden THP-1-Zellen mittels Elektroporation mit einer Vorläufer-miRNA (folgend: prä-miR-125a) bzw. einer Negativkontrolle (prä-miR-NC) transfiziert. In der isolierten RNA

aus den THP-1-Zellen wurde anschließend mittels qPCR die CCR2-mRNA-Expression bestimmt. Es zeigte sich hierbei eine um $32 \pm 7,0 \%$ verminderte Expression der CCR2 mRNA bei prä-miR-125a-transfizierten THP-1 im Vergleich zur Kontrolle.

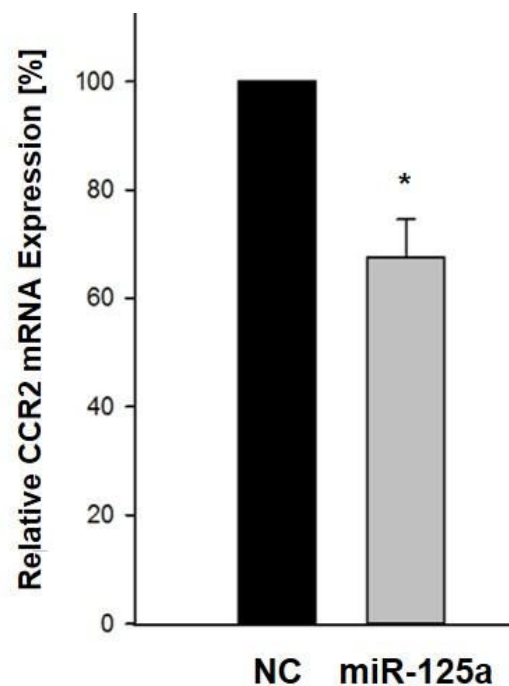


Abb. 11:

CCR2 mRNA-Expression in THP-1-Zellen nach Transfektion von prä-miR-125a

THP-1 wurden mit einer prä-miR-NC bzw. prä-miR-125a transfiziert, anschließend wurde RNA isoliert. Dargestellt ist die mRNA-Expression von CCR2. Die Ergebnisse wurden relativ zu miR-NC-transfizierten THP-1 dargestellt. Mittelwert \pm SEM, $n=4$, * $p<0,05$

Es sollte nun untersucht werden, ob miR-125a den CCR2 auch in primären humanen Monozyten reguliert. Dafür isolierten wir Pan-Monozyten mittels MACS-Negativselektion aus Apheresematerial und bestimmten zunächst die Reinheit der isolierten Zellen und die Effizienz ihrer Transfektion durchflusszytometrisch. Die Gruppe der Pan-Monozyten umfasst

dreier Subtypen: klassische CD14⁺⁺, intermediäre CD14⁺⁺CD16⁺ und nicht-klassische CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde durchflusszytometrisch mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern ermittelt, die gegen die Oberflächenmarker CD14 (PerCP-gekoppelt) und CD16 (Pacific Blue-gekoppelt) gerichtet sind. Hierbei zeigte sich folgende Verteilung der Monozytensubtypen: klassische Monozyten stellten den größten Anteil des Monozytenpools (80,2%), gefolgt von geringen Anteilen an intermediären (6,7%) und nicht-klassischen Monozyten (2,6%).

Die Verteilung des CCR2 auf der Monozytenoberfläche wurde mithilfe eines PE-gekoppelten CCR2-Antikörper untersucht, wobei die emittierte Fluoreszenz ein Maß für die CCR2-Expression darstellt. Auf diese Weise konnte auf 89,2% der Zellen das CCR2-Protein nachgewiesen werden.

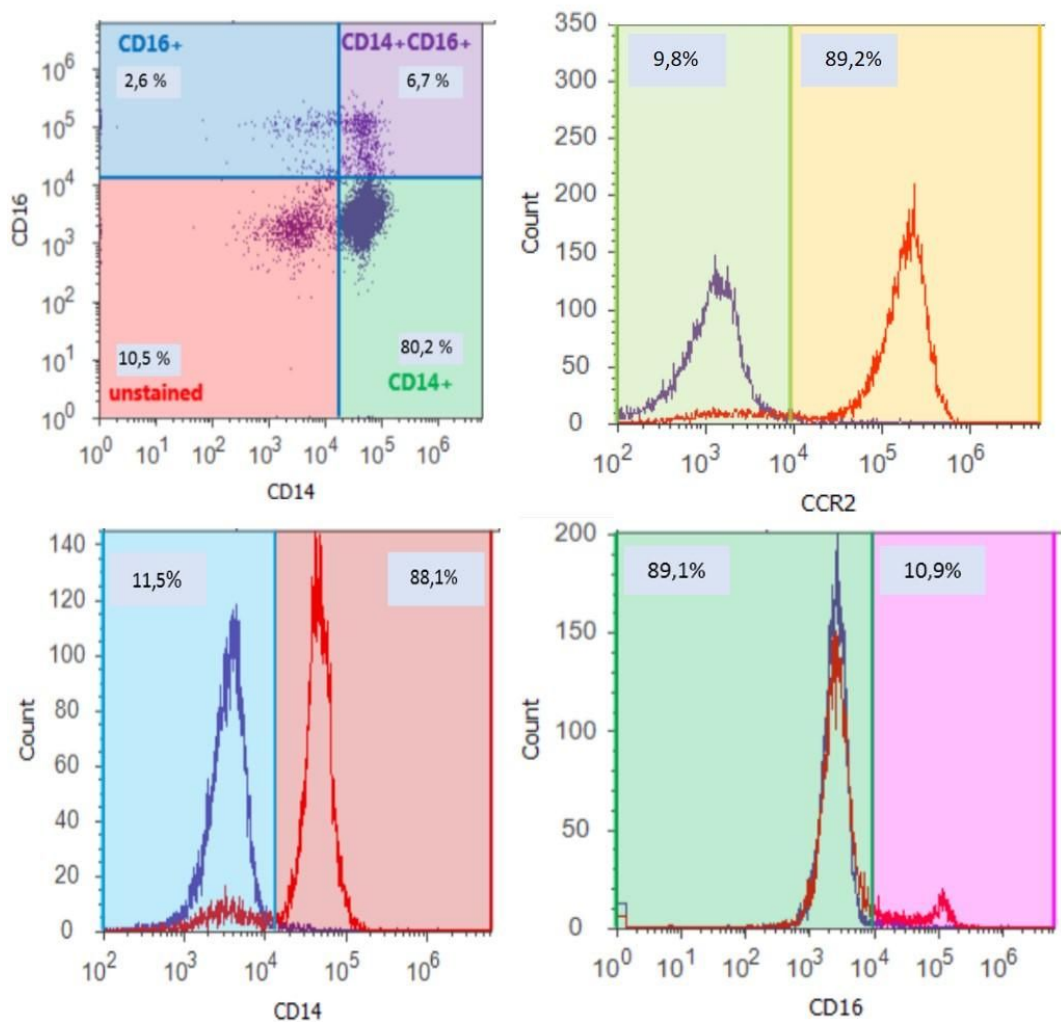


Abb. 12:

Reinheit isolierter Pan-Monozyten

Mittels MACS®-Negativselektion isolierte Pan-Monozyten gesunder Spender wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen CD14 (PerCP), CD16 (Pacific Blue) und CCR2 (PE) markiert und gemessen. Dargestellt ist eine repräsentative durchflusszytometrische Bestimmung.

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die frisch isolierten Pan-Monozyten mit CyTM3-konjugierter miR-Negative Control (Thermo Fisher Scientific) transfiziert. Hierbei konnte eine Transfektionseffizienz von etwa 65,88% (n=6) erzielt werden.

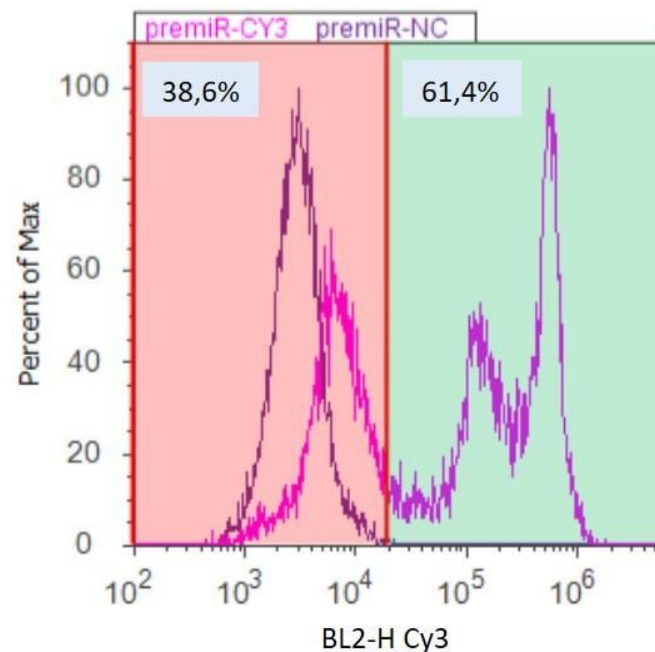


Abb. 13:

Transfektionseffizienz primärer Pan-Monozyten

Frisch isolierte humane Pan-Monozyten wurden mit einer CyTM 3-konjugierten microRNA Negativkontrolle transfiziert und die Transfektionseffizienz durchflusszytometrisch ermittelt. Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm von insgesamt sechs voneinander unabhängigen Bestimmungen mit einer durchschnittlichen Transfektionseffizienz von 65,88%.

Nach *in-silico*-Vorhersage sollte nun der CCR2 als putatives Zielgen der miR-125a in Monozyten validiert werden. Hierfür wurden primäre humane Monozyten mit prä-miR-125a bzw. einer miR-Negativkontrolle transfiziert, und die mRNA-Expression des CCR2 wurde

mittels qPCR quantifiziert. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der CCR2 mRNA um $49 \pm 5,6\%$.

Es wurde anschließend die Proteinexpression des CCR2 post transfectionem durch Western Blot-Analyse ermittelt. Auch hier zeigte sich 24 Stunden nach Transfektion mit prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC eine Reduktion der Proteinexpression um $72 \pm 6,0\%$.

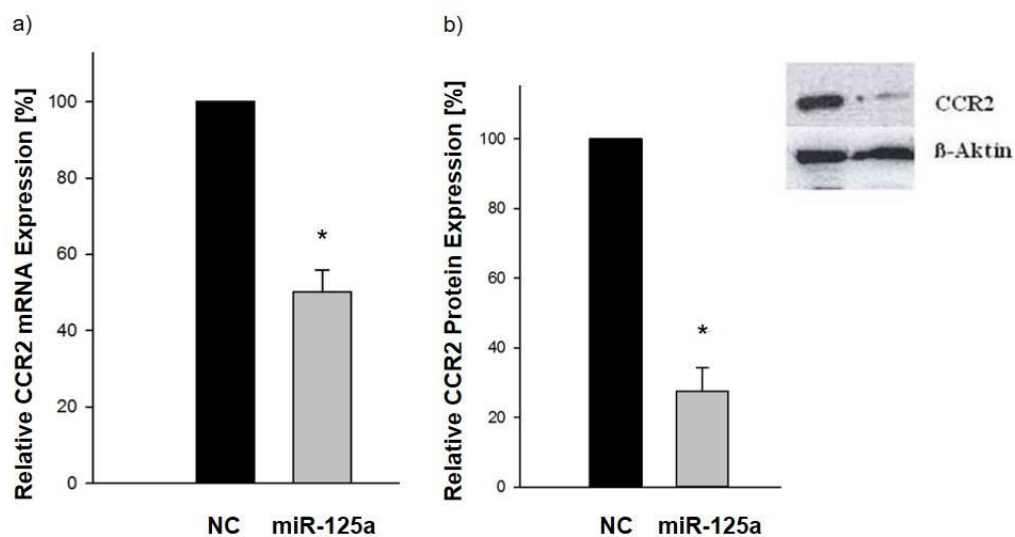


Abb. 14:

CCR2 mRNA- und Proteinexpression nach Transfektion von prä-miR-125a

Primäre Pan-Monozyten wurden mit prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC transfiziert, anschließend wurde RNA bzw. Gesamtprotein isoliert. Die CCR2 mRNA-Expression wurde mittels qPCR untersucht, die CCR2 Proteinexpression durch Western Blot-Analyse.

- CCR2 mRNA-Expression in prä-miR-125a- bzw. prä-miR-NC transfizierten Monozyten. Die Ergebnisse sind relativ zu prä-miR-NC transfizierten Monozyten dargestellt. Mittelwert \pm SEM, $n=10$, $*p<0,01$
- CCR2 Proteinexpression relativ zu prä-miR-NC, Mittelwert \pm SEM, $n=3$, $*p<0,01$. Dargestellt ist eine repräsentative Abbildung aus $n=3$ Einzelversuchen, als Ladekontrolle wurde β -Aktin aufgetragen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression des CCR2 auf humanen Monozyten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene tatsächlich durch miR-125a reguliert wird.

4.2. Der CCR2 wird über zwei Bindungsstellen in der 3'UTR direkt durch miR-125a reguliert

Da eine Reduktion des CCR2 in Monozyten nach Transfektion der prä-miR-125a zu beobachten war, sollte nun untersucht werden, ob es sich um eine direkte Regulation durch Bindung der miRNA an den 3'UTR des CCR2-Gens handelt. Hierzu wurde die 3'UTR des CCR2-Gen in die Multiple Cloning Site (MCS) des PsiCheck2-Reportervektors kloniert, welche strangabwärts des Renilla-Reporter-Luciferase-Gens ohne eigene Promotorregion liegt. Eine verminderte Aktivität der Renilla-Luciferase ist somit ein direktes Maß für die Wechselwirkung der 3'UTR mit der miRNA. Ein zweites Gen, welches für die Firefly-Luciferase kodiert, wird konstitutiv exprimiert und dient der Normalisierung der Transfektionseffizienz.

Nach Co-Transfektion von HEK293-Zellen mit dem CCR2-Reportervektor und der prä-miR-125a beziehungsweise einer Kontroll-miR wurde nach einer Inkubationszeit von 40 Stunden post transfectionem die Lumineszenz gemessen und der Quotient aus der Renilla- und der Firefly-Luciferase-Expression gebildet. Es zeigte sich eine Reduktion von $50 \pm 3,0\%$. Die beiden *in silico* vorhergesagten Bindungsstellen wurden nachfolgend validiert. Es wurden mittels Punktmutationen sequentiell die Bindestellen der miR-125a in der CCR2 3'UTR inaktiviert; diese mutierten 3'UTRs wurden in den PsiCheck2-Reportervektor kloniert, der dann jeweils zusammen mit prä-miR-125 bzw. prä-miR-NC in HEK293-Zellen co-transfiziert wurde. Nach Mutation der ersten miR-125a-Bindestelle verminderte sich die Luciferaseaktivität gegenüber der prä-miR-NC um $20 \pm 1,0 \%$, nach Inaktivierung der zweiten Bindestelle um $10 \pm 3,0 \%$. Die Mutation beider Bindestellen hatte eine vollständige Aufhebung der Regulation zur Folge ($1,08 \pm 0,1$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass miR-125a den CCR2 durch Bindung an die zwei prädizierten Bindungsstellen direkt reguliert und dass eine Mutation beider Bindestellen die Regulation durch miR-125a vollständig inhibiert.

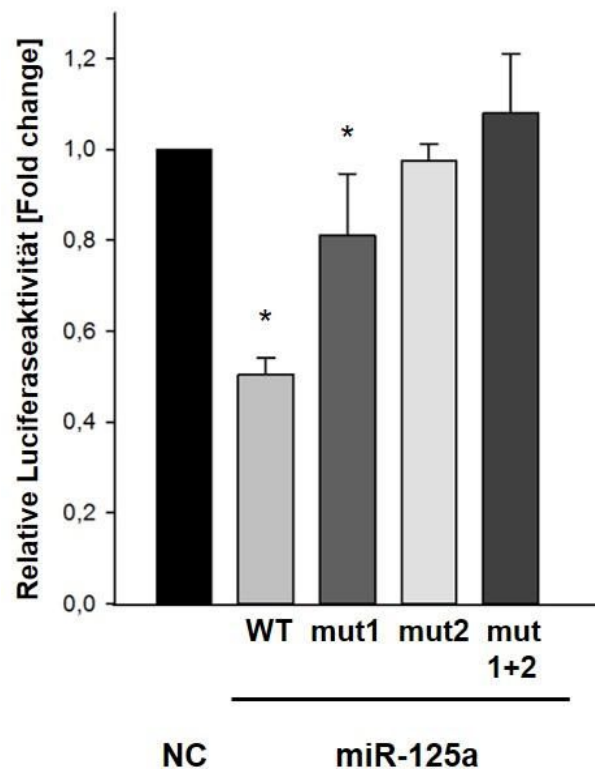


Abb. 15:

Direkte Regulation der CCR2-Expression durch miR-125a

Die CCR2-3'UTR wurde in den PsiCHECK2-Reportervektor kloniert und in HEK293-Zellen mit prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC co-transfiziert. Dargestellt sind die CCR2-3'UTR als Wildtyp sowie Reporterkonstrukte mit deletierten miR-125a-Bindestellen (mut1: Bindestelle 1 mutiert, mut2: Bindestelle 2 mutiert, mut1+2: BS1 und BS2 mutiert)

Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität (Rluc/Fluc) in [Fold change]. Mittelwert \pm SEM, n= 10, WT: * $p < 0,01$, mut1: * $p < 0,05$, mut2: n.s., mut1+2: n.s.

4.3. Die Interaktion von miR-125a und CCR2 reguliert das Migrationsverhalten von primären humanen Monozyten

Um die phänotypischen Auswirkungen einer Regulation des Schlüsselrezeptors der Chemotaxis von Monozyten, dem CCR2, durch miR-125a in Monozyten zu evaluieren, wurde zunächst deren Migrationsverhalten nach Transfektion von prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC mithilfe der Boyden-Kammer untersucht.

Tatsächlich zeigten miR-125a-transfizierte Monozyten eine signifikant geringere Migrationsrate von $31 \pm 1,0 \%$ als Monozyten, die mit entsprechender Negativkontrolle transfiziert wurden.

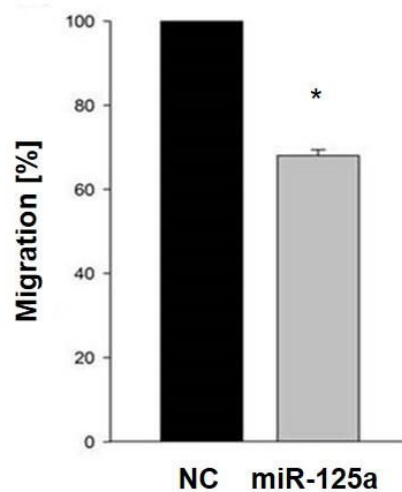


Abb. 16:

Durchflusssyztometrische Quantifizierung der migrierten Monozyten

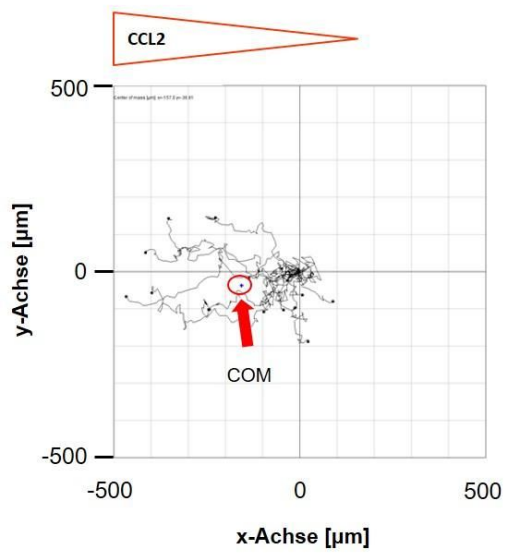
Prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC transfizierte Monozyten wurden in das obere Kompartiment der Boyden-Kammer pipettiert. Um eine gerichtete Migration der Zellen auszulösen, wurde in das untere Kompartiment CCL2 zu dem Zellkulturmedium gegeben und der Ansatz 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die transmigrierten Zellen aus dem unteren Kompartiment geerntet und durchflusssyztometrisch quantifiziert. Mittelwert \pm SEM, $n=4$, $*p<0,01$

Die Boyden-Kammer kann einen Konzentrationsgradienten über die Messdauer nicht konstant aufrecht erhalten. Um die Ergebnisse daher zu überprüfen, wurden transfizierten Monozyten über vier Stunden einem stabilen Konzentrationsgradienten ausgesetzt und jede Zellbewegung wurde echtzeitmikroskopisch aufgenommen.

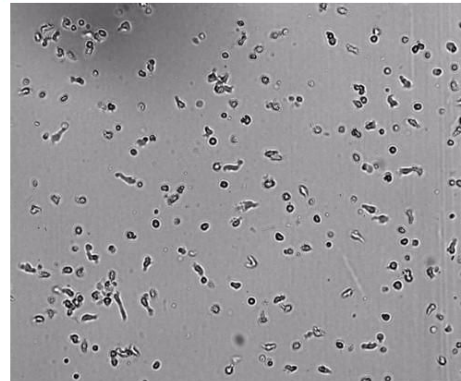
Wie in Abb. 17 dargestellt, zeigen prä-miR-NC-transfizierte Monozyten auch in Echtzeit eine deutliche Migration entlang des Gradienten zum CCL2 hin, während bei prä-miR-125a-transfizierten Monozyten ein völliger Verlust der zielgerichteten Migration zu beobachten ist. Die prozentuale Veränderung des Massenschwerpunktes der Zellen lag bei prä-miR-125a-transfizierten Monozyten bei $15 \pm 6,0$ % relativ zu dem Massenschwerpunkt von miR-NC-transfizierten Zellen.

Um zu verifizieren, dass dieser Effekt tatsächlich CCR2-vermittelt ist, wurde in frisch isolierten humanen Monozyten ein Knockdown des CCR2 mittels spezifischer siRNA durchgeführt und erneut ein Chemotaxisassay durchgeführt. Es zeigte sich, dass hinsichtlich der Migrationseigenschaften ein Knockdown des CCR2 in Monozyten zu ähnlichen Effekten wie die Transfektion der prä-miR-125a führt: Der Massenschwerpunkt siCCR2-transfizierter Monozyten lag im Vergleich zur siNC dem Koordinatenursprung deutlich näher, es lag keine zielgerichtete Chemotaxis zum CCL2 hin mehr vor (COM= $13 \pm 6,0$ % relativ zu dem Massenschwerpunkt von miR-NC-transfizierten Monozyten).

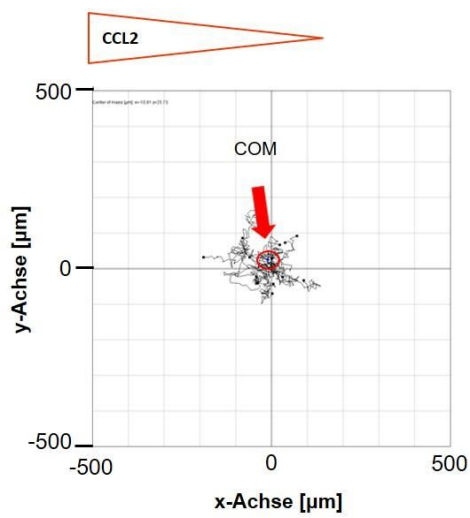
a) ■ NC



CCL2



■ miR-125a



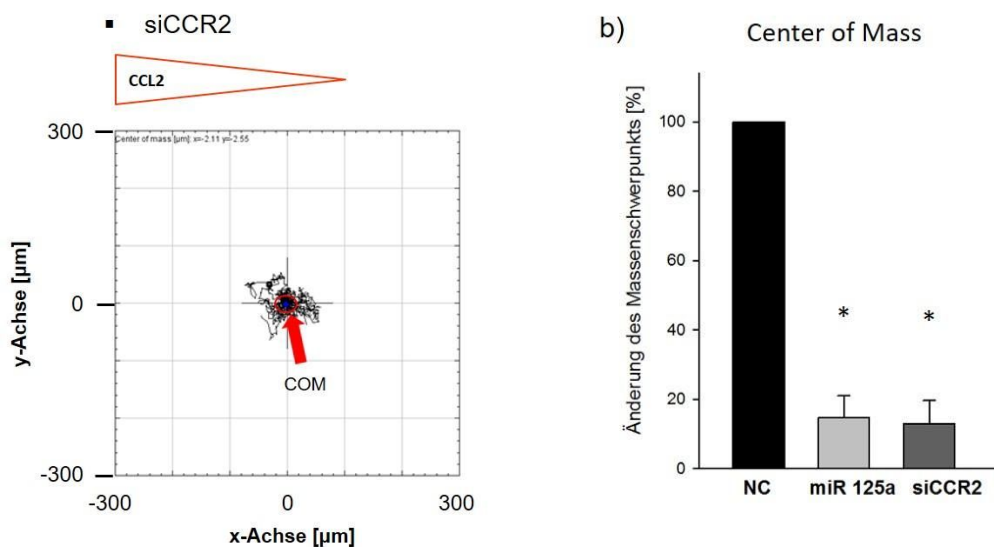


Abb. 17:

Echtzeitmikroskopische Untersuchung der gerichteten Migration transfizierter Monozyten

Nach Transfektion von Monozyten mit prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC wurden diese in einer 3D-Matrix in den Beobachtungskanal einer μ -Slide Chemotaxis (ibidi GmbH) pipettiert. Durch Zugabe des CCR2-selektiven Liganden CCL2 in einem der anliegenden Reservoirs wurden die Monozyten einem chemotaktischen Gradienten ausgesetzt und die Bewegung der Zellen wurde über 4 Stunden dokumentiert.

- Dargestellt ist die Verschiebung des Center of Mass (Schwerpunkt der Zellendpunkte) bei manuellem Tracking der Monozytenbewegungen. Repräsentativ jeweils das Startbild von prä-miR-NC- bzw. prä-miR-125a-transfizierten Monozyten.
- Es wird die prozentuale Veränderung des Massenschwerpunktes dargestellt. Mittelwert \pm SEM, n= 3, prä-miR-125a: * p< 0,01, siCCR2: *p< 0,01

4.4. Identifikation des funktionellen Netzwerks der miR-125a führt zur potenziellen Regulation von zwei junktionalen Adhäsionsmolekülen: JAM-A und JAM-L

Im Gegensatz zu spezifischen siRNAs sind miRNAs in der Lage, eine Vielzahl von Zielgenen zu regulieren. Zudem kann eine proteincodierende mRNA von vielen miRNAs reguliert werden. In der Regel agieren miRNAs daher in funktionellen Netzwerken und regulieren weitere Transkripte in dem Interaktom des Zielgens, die verwandte Signalkaskaden simultan regulieren. In einer Expressionsanalyse des gesamten Transkriptoms (IMGH Laboratories GmbH, Martinsried) wurde Gesamt-RNA von prä-miR-125a- bzw. prä-miR-NC-transfizierten Monozyten auf das funktionelle Netzwerk der miR-125a untersucht. Es wurden durch Pathway-Analyse mit Hilfe von KEGG und STRING vier besonders stark regulierte Pathways (Zytokin-Zytokin Rezeptor Interaktion, Chemokin-Signalweg, Wnt-Signalweg, Rap1 Signalweg) identifiziert, die alle in der monozytären Adhäsion eine zentrale Rolle einnehmen.

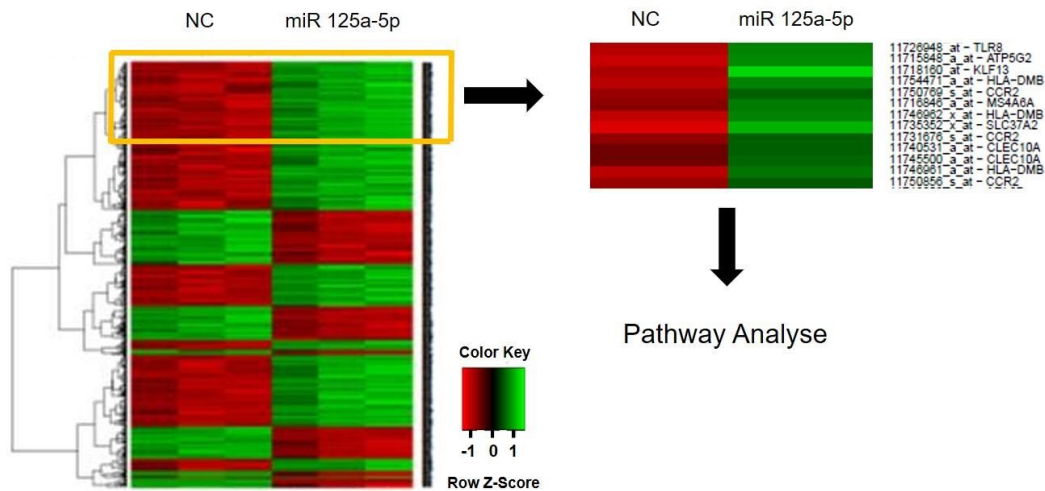


Abb. 18:

Heatmap der differenziell regulierten Gene in Monozyten nach Transfektion mit prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC

Prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC transfizierte Monozyten wurden mittels Affymetrix GeneChip® Prime View™ Human Gene Expression Array (IMG M Laboratories GmbH, Martinsried) in einer genomweiten Expressionsanalyse auf differenziell regulierte Gene untersucht. Die Farbskala reicht von hellgrün (minimale Expression) bis dunkelrot (starke Expression). Die identifizierten Gene wurden einer Pathway-Analyse unterzogen und mittels qPCR validiert.

Die im Array differenziell am stärksten regulierten Gene C-C Motif Chemokine Receptor 2 (CCR2), Junction Adhesion Molecule Like (JAM-L), und Junction Adhesion Molecule A (JAM-A), V-Set and immunoglobulin domain containing 4 (VSIG4), Semaphorin 4D (SEMA4D), fms related Tyrosine Kinase (FLT3), Selectin P Ligand (SELPLG), ATP binding Cassette Subfamily C Member 4 (ABCC4), G-protein-coupled Receptor Kinase 5 (GRK5), Phospholipase C Beta 2 (PLCB2), Paxillin (PXN) und Interleukin 10 Receptor Subunit Alpha (IL-10RA) wurden mittels qPCR validiert. Eine signifikante Regulation durch prä-miR-125a fand sich hier bei FLT3 ($-0,38 \pm 0,02$), VSIG4 ($-0,25 \pm 0,06$), ABCC4 ($-0,18 \pm 0,05$), JAM-A ($-42 \pm 2,0 \%$) und JAM-L ($-41 \pm 5,0 \%$).

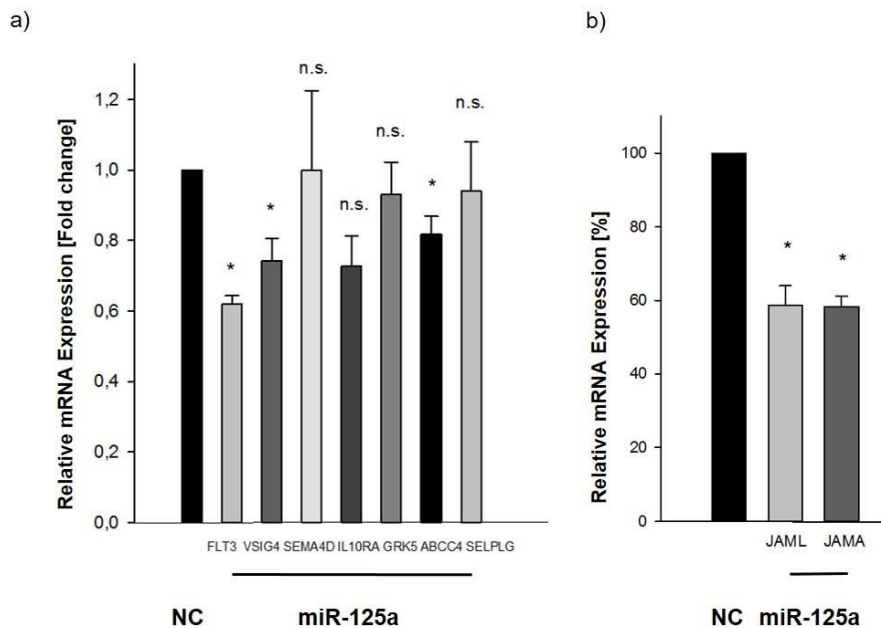


Abb. 19:

Evaluation der Zielgene der Expressionsanalyse mittels Affymetrix GeneChip® Prime View™ Human Gene Expression Assay

Humane Monozyten wurden mit prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC transfiziert und eine genomweite Expressionsanalyse durchgeführt. Hieraus putativ regulierte Gene aus Signalkaskaden der Adhäsion wurden mittels qPCR-Experimenten auf ihre mRNA-Expression nach prä-miR-125a- bzw. prä-miR-NC-Transfektion validiert.

- mRNA-Expression in transfizierten Monozyten von FLT3 (* $p < 0,01$), VSIG4 (* $p < 0,01$), SEMA4D (n.s.), IL10RA (n.s.), GRK5 (n.s.), ABCC4 (* $p < 0,05$) und SELPLG (n.s.). Mittelwert \pm SEM, $n = 6$
- mRNA-Expression in transfizierten Monozyten von JAM-L und JAM-A. Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * $p < 0,01$

Die deutliche Regulation der zwei Gene der Superimmunoglobulin-Familie (JAM-A, JAM-L) wies auf eine Beteiligung der miR-125a in der Adhäsion hin, weshalb darauf im weiteren Verlauf fokussiert wurde. Zunächst folgte eine Darstellung von JAM-A am

Attune-Durchflusszytometer nach Transfektion von Monozyten mit prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC. Nach Transfektion und Fc-Rezeptor-Block wurden die Monozyten mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern gegen JAM-A gefärbt und das entstandene FITC-Fluoreszenzsignal unter Verwendung des 488 nm Laser und eines 530 nm/30 nm Lasers detektiert. Es bestätigte sich hier die Regulation durch miR-125a: die JAM-A Proteinexpression verminderte sich $0,2 \pm 0,05$ -fach nach prä-miR-125a-Transfektion.

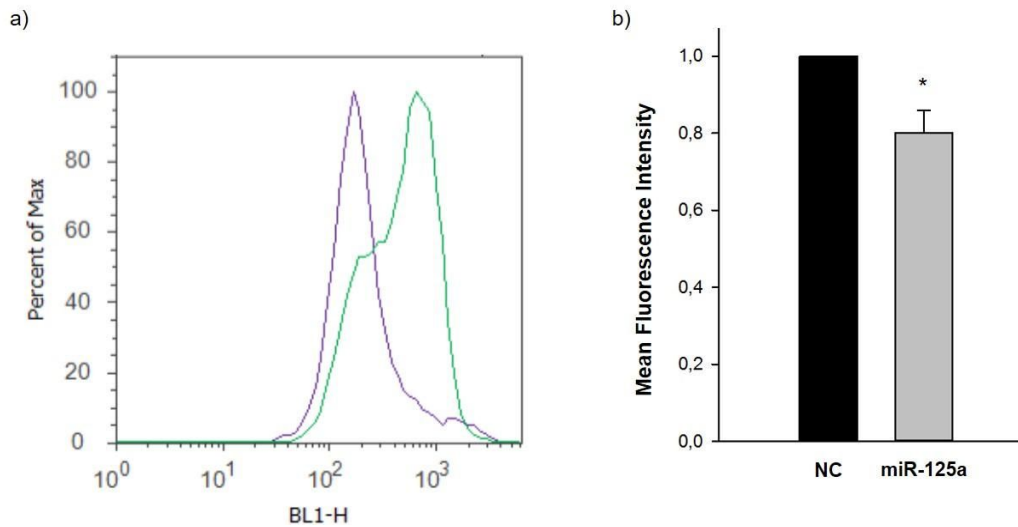


Abb. 20:

Durchflusszytometrische Bestimmung der Proteinexpression des miR-125a Zielgens JAM-A nach Transfektion der prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC

Monozyten wurden nach Transfektion mit prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC geerntet und nach Fc-Rezeptor-Block mit einem FITC-Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper gegen JAM-A gefärbt. Das Fluoreszenzsignal wurde unter Verwendung des 488 nm Lasers und eines 530 nm/30 nm Emissionsfilters detektiert.

- Repräsentative JAM-A- Färbung von insgesamt sechs unabhängigen Messungen. Jeweils in grün dargestellt ist das FITC-Fluoreszenzsignal der miR-NC transfizierten Monozyten, violett bildet die prä-miR-125a transfizierten Monozyten ab.
- Dargestellt ist die Mean Fluorescence Intensity. Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * $p < 0,01$

4.5. Klonierung der 3'UTR in Reportervektoren bestätigt die direkte Regulation von JAM-A und JAM-L durch miR-125a

Um eine direkte Regulation der miR-125a an der 3'-UTR von JAM-A bzw. JAM-L nachzuweisen, wurden beide 3'-UTRs jeweils in den PsiCheck2-Reportervektor kloniert. Nach transienter Cotransfektion des Plasmids und der prä-miR-125a in HEK293-Zellen wurde eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität bei JAM-A um $45 \pm 2,0$ % und $26 \pm 7,0$ % bei JAM-L gemessen (n=6). Die damit gezeigte direkte Regulation der beiden Vertreter der Superimmunoglobulin Familie I legt eine Beteiligung der miR-125a auch an der Rekrutierung von Monozyten nahe.

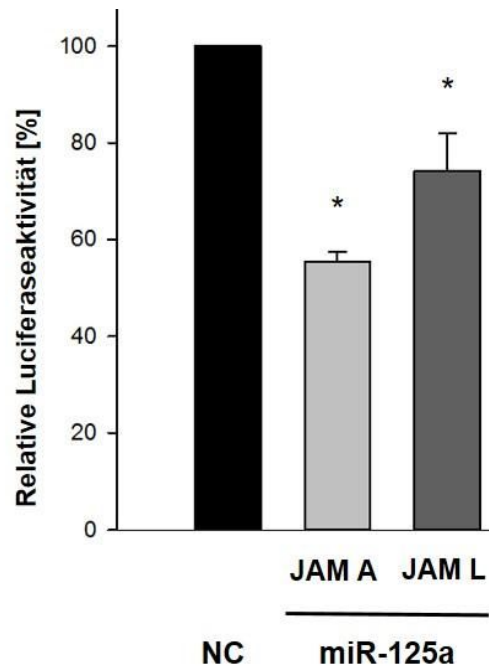


Abb. 21:

Direkte Bindung der miR-125a an die JAM-A und JAM-L 3'UTR

Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität (Rluc/Fluc in [%]) nach Co-Transfektion von HEK293-Zellen mit dem jeweiligen Reporterkonstrukt (JAM-A-3'UTR bzw. JAM-L-3'UTR) und der prä-miR-125a bzw. miR-NC. Mittelwert \pm SEM, n= 6, JAM-A: *p< 0,01, JAM-L: *p< 0,01

4.6. miR-125a reguliert die Adhäsion von Monozyten durch ihre Targets JAM-A, JAM-L und CCR2

Nachdem eine direkte, durch miR-125a vermittelte Regulation der beiden junctionalen Adhäsionsmoleküle JAM-L und JAM-A gezeigt werden konnte, wurde im Folgenden untersucht, ob sich das Adhäsionsverhalten der Monozyten nach prä-miR-125a-Überexpression verändert. Dazu wurden humane Monozyten gesunder Spender isoliert und anschließend mit prä-miR-125a oder der entsprechenden

Negativkontrolle transfiziert. Um den physiologischen Zustand in der Arterie im *in-vitro*-Modell näherungsweise zu simulieren, wurden humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) unter Flussbedingungen kultiviert und mittels $\text{TNF}\alpha$ aktiviert. Es erfolgte zudem eine Calcein-Färbung der viablen Monozyten, welche adhärente Zellen sichtbar macht. Bestimmung der Calceinfluoreszenz zeigte eine signifikante Reduktion von $32 \pm 8,0 \%$ bei prä-miR-125a-transfizierten Monozyten im Gegensatz zur Negativkontrolle.

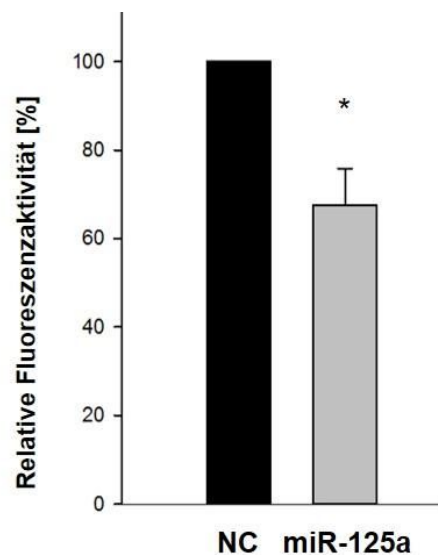
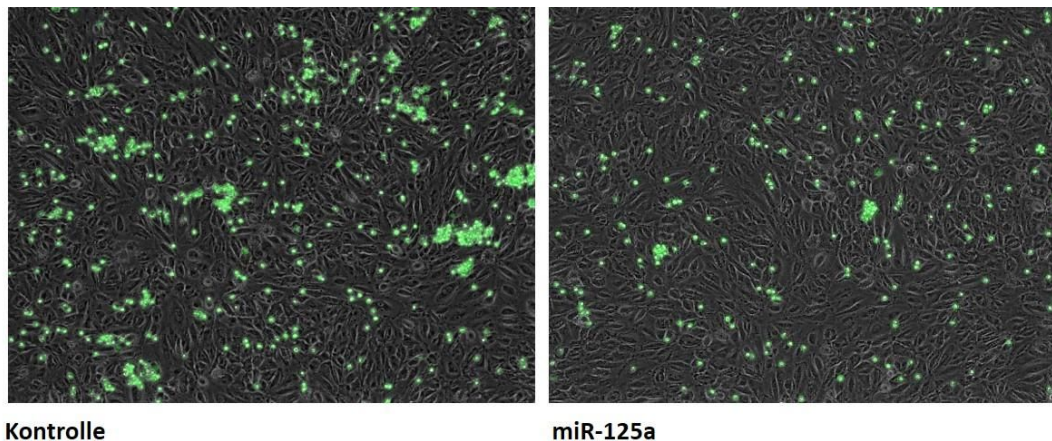


Abb. 22:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme Calcein-gefärbter adhärenter Monozyten nach Transfektion mit prä-miR-125a und miR-NC mit anschließendem Calceinassay

Monozyten wurden mit prä-miR-125a bzw. miR-NC transfiziert und vor der Perfusion über TNF α -aktiviertes Endothel mittels Calcein lebend-gefärbt. Nach 45 Minuten Perfusion wurden die viablen, adhärenen Monozyten fluoreszenzmikroskopisch erfasst, anschließend geerntet und die jeweilige Fluoreszenzintensität gemessen. Dargestellt ist der auf die Negativkontrolle normalisierte Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen. Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme entspricht einem repräsentativen Ausschnitt. Vergrößerung 40x.

Der CCR2 ist bei der Adhäsion am inflammierten Endothel essenziell, da dieser durch endothelial gebundenes CCL2 die Monozyten stimuliert und deren Geschwindigkeit reduziert. Die junctionalen Adhäsionsmoleküle vermitteln die sich anschließende feste Adhäsion und Transmigration durch das Endothel. Um zu untersuchen, ob die reduzierte Adhäsion tatsächlich durch die drei evaluierten Targets CCR2, JAM-A und JAM-L vermittelt wird, wurde in Monozyten ein CCR2-, JAM-A- bzw. JAM-L-Knockdown mit Hilfe von siRNA durchgeführt und die Adhäsionsuntersuchung wiederholt. Es zeigte sich hierbei nach CCR2-Knockdown eine reduzierte Adhäsion der Monozyten um $28 \pm 9,0 \%$, nach JAM-A-Knockdown um $25 \pm 8,0 \%$ und nach JAM-L-Knockdown um $38 \pm 12,0 \%$. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die reduzierte Adhäsion der Monozyten nach prä-miR-125a-Transfektion durch eine Regulation aller drei Zielgene CCR2, JAM-A und JAM-L vermittelt wird.

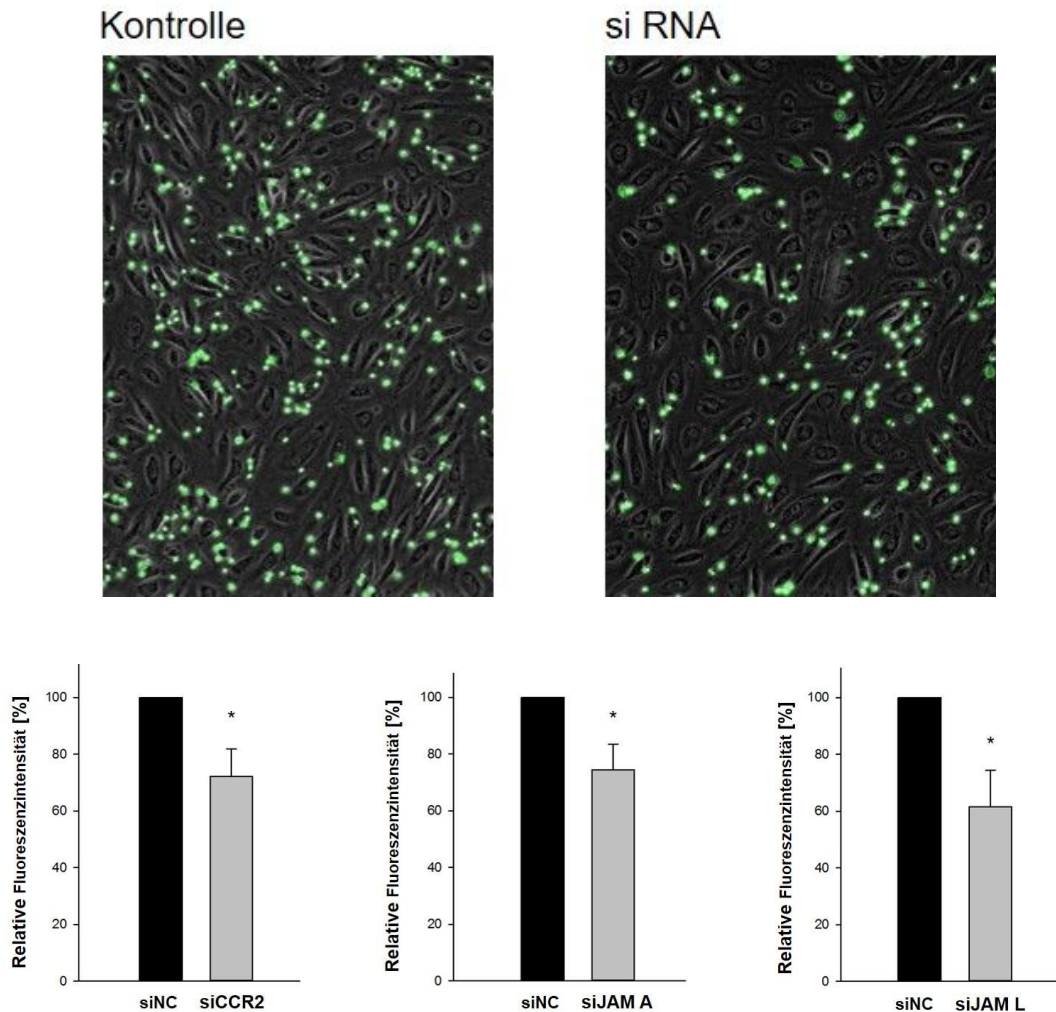


Abb. 23:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme Calcein-gefärbter adhärenter Monozyten nach Knockdown mittels siRNA gegen CCR2, JAM-L und JAM-A mit anschließendem Calceinassay

In frisch isolierten humanen Monozyten wurden mittels siRNA gegen CCR2, JAM-L bzw. JAM-A ein Knockdown durchgeführt und vor der Perfusion über TNF α -aktiviertes Endothel mittels Calcein lebend-gefärbt. Nach 45 Minuten Perfusion wurden die viablen, adhärenen Monozyten fluoreszenzmikroskopisch erfasst, anschließend geerntet und die jeweilige Fluoreszenzintensität gemessen. Dargestellt ist der auf die Negativkontrolle siNC normalisierte Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen. Mittelwert \pm SEM, siCCR2: * $p < 0,05$, siJAM-L: * $p < 0,05$, siJAM-A: * $p < 0,05$. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme entspricht einem repräsentativen Ausschnitt nach siCCR2 Knockdown. Vergrößerung 40x.

4.7. Die miR-125a-Expression in humanen Monozyten wird durch das umgebende Milieu reguliert

Chemotaxis und Migration sind essenzielle Funktionen des Monozyten um an den Ort der Inflammation zu kommen. Hier wird er ortsständig und nimmt seine Effektorfunktionen auf. Es sollte nun untersucht werden, ob das die Monozyten umgebende Milieu im inflammatorischen Areal potenziell auch Einfluss auf die Expression von miR-125a und CCR2 hat.

Dafür wurde zunächst eine Inflammation durch einen bakteriellen Stimulus simuliert. Frisch isolierte humane Monozyten wurden über 3,5 Stunden mit LPS stimuliert, anschließend wurde die Gesamt-RNA extrahiert. Nach reverser Transkription wurde die CCR2-, JAM-L und JAM-A-mRNA-Expression mittels qPCR bzw. miR-125a-Expression mittels eines spezifischen TaqMan-Assay bestimmt. Hierbei zeigt sich eine signifikante Reduktion des CCR2 um $90 \pm 3,0 \%$, JAM-A ($70 \pm 3,0 \%$) und JAM-L ($20 \pm 7,0 \%$) bei gleichzeitiger signifikanter Zunahme der miR-125-Expression um $31 \pm 9,0 \%$.

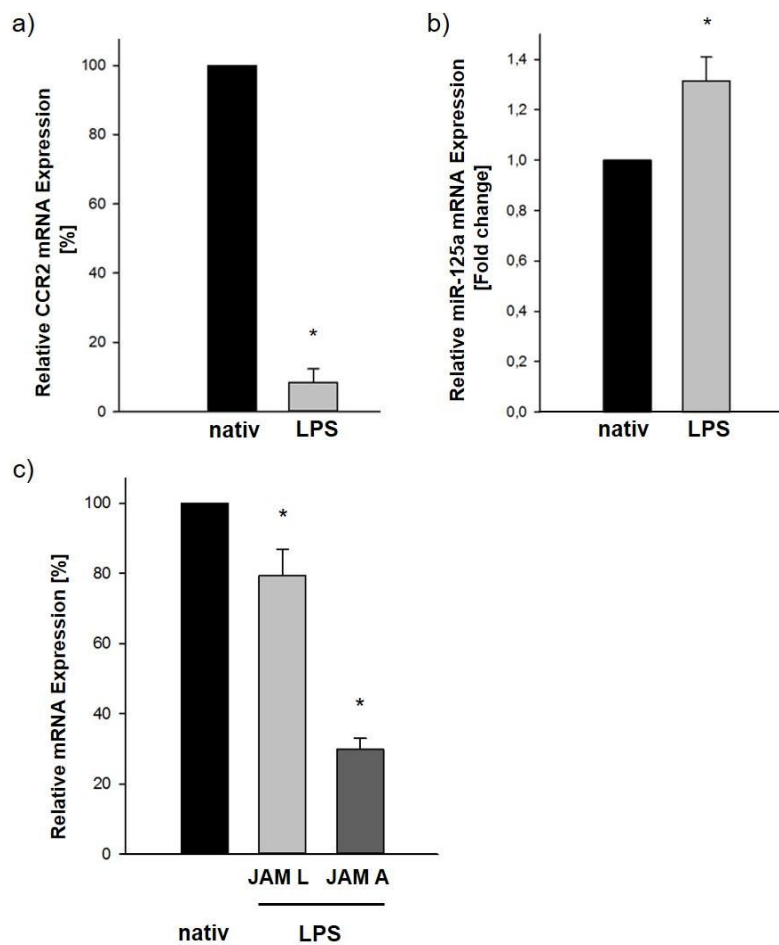


Abb. 24:

miR-125a- bzw. CCR2, JAM-L und JAM-A-mRNA-Expression in humanen Monozyten nach Stimulation mit LPS (*E.coli*)

Humane Monozyten wurden mit 50 ng/mL LPS für 3,5 Stunden stimuliert, anschließend wurde RNA isoliert.

- CCR2-mRNA-Expression (LPS stimuliert vs native Monozyten). Die Ergebnisse wurden relativ zu nativen Monozyten dargestellt. Mittelwert \pm SEM, $n=5$, $*p<0,01$
- miR-125a-Expression (LPS stimuliert vs native Monozyten). Die Ergebnisse wurden relativ zu nativen Monozyten dargestellt. Mittelwert \pm SEM, $n=5$, $*p=0,05$
- JAM-L bzw. JAM-A-mRNA-Expression. Die Ergebnisse wurden relativ zu nativen Monozyten dargestellt. Mittelwert \pm SEM, $n=4$, JAM-L: $*p<0,05$, JAM-A: $*p<0,05$

Alleinige Zugabe des Chemokins CCL2 hingegen hatte keinen Einfluss auf das Expressionsmuster von miR-125a und CCR2($-0,07 \pm 0,06$) noch der miR-125 ($0,06 \pm 0,1$).

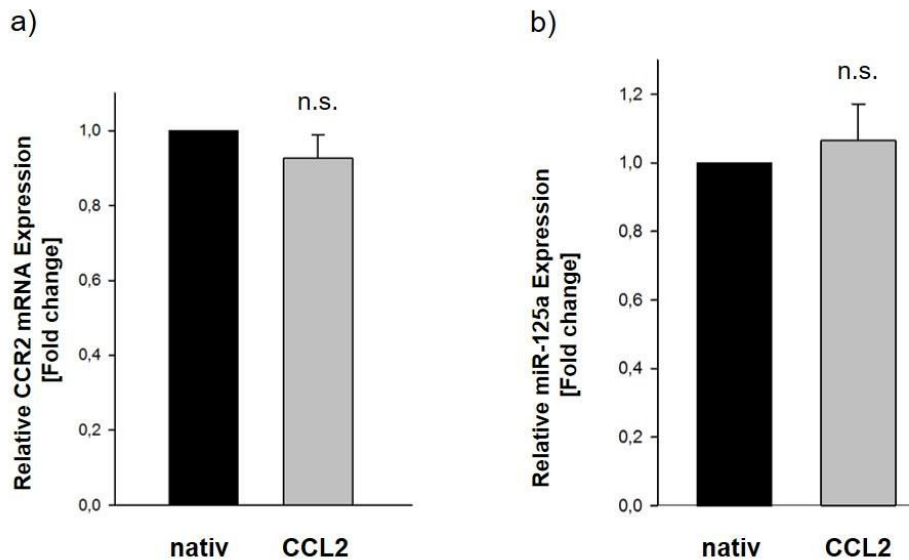


Abb. 25:

CCR2-mRNA-Expression und miR-125a-Expression in humanen Monozyten nach Stimulation mit CCL2

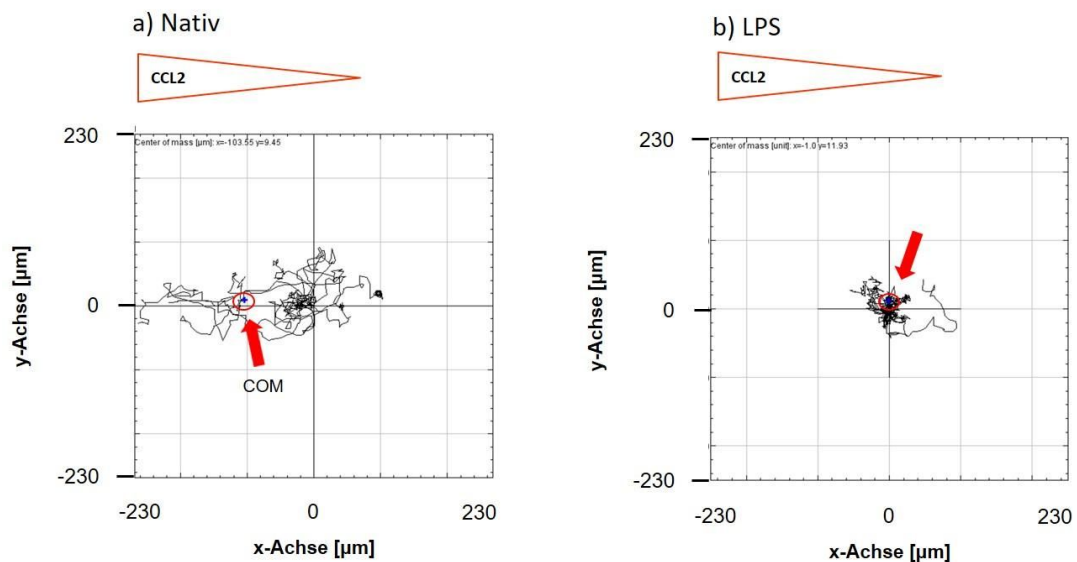
Primäre Monozyten wurden mit 25 ng/mL CCL2 stimuliert und die CCR2-mRNA- bzw. miR-125a-Expression wurde untersucht.

- CCR2-mRNA-Expression (CCL2 stimuliert vs native Monozyten). Die Ergebnisse sind relativ zu nativen Monozyten dargestellt. Mittelwert \pm SEM, $n=3$, n.s.
- miR-125a-Expression (CCL2 stimuliert vs native Monozyten), relativ zu nativen Monozyten. Mittelwert \pm SEM, $n=3$, n.s.

4.8. LPS induziert die miR-125a-Expression und führt über die dadurch bedingte verminderte CCR2-Expression zur Ortsständigkeit von Monozyten

Ist der Monozyt durch Chemotaxis und Diapedese im inflammatorischen Areal angelangt, wird er dort ortsständig und nimmt seine Effektorfunktionen auf. Da die Expression des

CCR2 und der miR-125 durch LPS beeinflusst werden konnte, sollte untersucht werden, ob dies zum Erliegen der Chemotaxis führt. Hierfür wurde erneut ein Chemotaxisassay am Echtzeitmikroskop durchgeführt. Es zeigte sich, dass der Massenschwerpunkt von Monozyten, die mit 0,5 ng/mL LPS behandelt wurden, am Koordinatenursprung lag (COM = $7,3 \pm 1,9$ % relativ zu dem Massenschwerpunkt nativer Monozyten), einhergehend mit einem ungerichteten Bewegungsprofil, wohingegen native Monozyten eine deutliche Migration zum CCL2 hin zeigten.



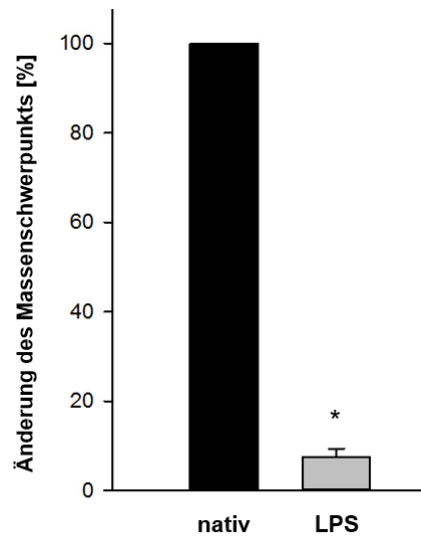


Abb. 26:

Echtzeitmikroskopische Untersuchung der gerichteten Migration von Monozyten nach Stimulation mit LPS

Nach Stimulation von Monozyten mit 50 ng/mL LPS über 20 Stunden wurden diese, bzw. native Monozyten, in die 3D-Collagen-Matrix des Beobachtungskanals der μ -Slide Chemotaxis pipettiert.

CCL2 wurde in eines der anliegenden Reservoirs gefüllt und die Bewegung der Monozyten über 4 Stunden dokumentiert.

a,b) Dargestellt ist die Verschiebung des Center of Mass (Schwerpunkt der Zellendpunkte) bei manuellem Tracking der Monozytenbewegungen

c) Es wird die prozentuale Veränderung des Massenschwerpunktes dargestellt.
Mittelwert \pm SEM, n= 3, * p< 0,01

4.9. Die Regulation der miR-125a ist abhängig vom bakteriellen Serotypen des LPS

Lipopolysaccharid S ist der Hauptbestandteil der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien. Es ist ein bakterielles Makromolekül, welches aus drei strukturell verschiedenen Komponenten besteht:

1. Lipid A, einem hydrophoben Di-Glucosamin-basiertem Lipid, das den Anker des LPS an die mikrobielle Membran darstellt
2. Polysaccharid-Ketten, welche die hydrophile Kernregion darstellen
3. O-Antigen, eine hydrophile Oligosaccharid-Einheit, die aus mehreren verzweigten Zuckern besteht und spezifisch für den bakteriellen Serotypen ist

Da die Struktur essenzielle Auswirkungen auf das TLR4-Signalling hat, sollte nun untersucht werden, ob sich das LPS unterschiedlicher bakterieller Serotypen auch auf die CCR2 und miR-125a – Expression in primären humanen Monozyten auswirkt. Dafür wurden Monozyten direkt nach der Isolierung mit 0,5 ng/mL LPS verschiedenen Ursprungs (*E.coli* / *Pseudomonas aeruginosa* / *Klebsiella pneumoniae*) für 3,5 Stunden inkubiert. Es zeigte sich hier, dass abhängig vom bakteriellen Serotypen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene der CCR2 durch LPS divers reguliert wird. Während LPS von *E.coli* und *Klebsiella pneumoniae* eine vergleichbare verminderte Expression der CCR2-mRNA hervorrufen (CCR2-Reduktion bei *E.coli*: $0,8 \pm 0,07$ -fach, Klebs.: $0,76 \pm 0,03$ -fach , n=3) führte LPS von *Pseudomonas aeruginosa* nur zu einer Reduktion von $0,3 \pm 0,03$ -fach. Passend dazu stieg die miR-125a-Expression nach *Klebsiella pneumoniae*-LPS-Stimulation um das 2,4 -fache $\pm 0,5$ an (*E.coli* 2,5 -fach $\pm 0,78$), wohingegen LPS von *Pseudomonas aeruginosa* zu einem niedrigen Anstieg ($1,3$ -fach $\pm 0,3$) führte (n=3).

Das Protein wurde mittels eines PE-gekoppelten Antikörpers gegen den CCR2 durchflusszytometrisch untersucht. Es zeigte sich hierbei ein deutlicher Unterschied in der CCR2-Protein-Expression, ein exemplarisches Bild ist dargestellt.

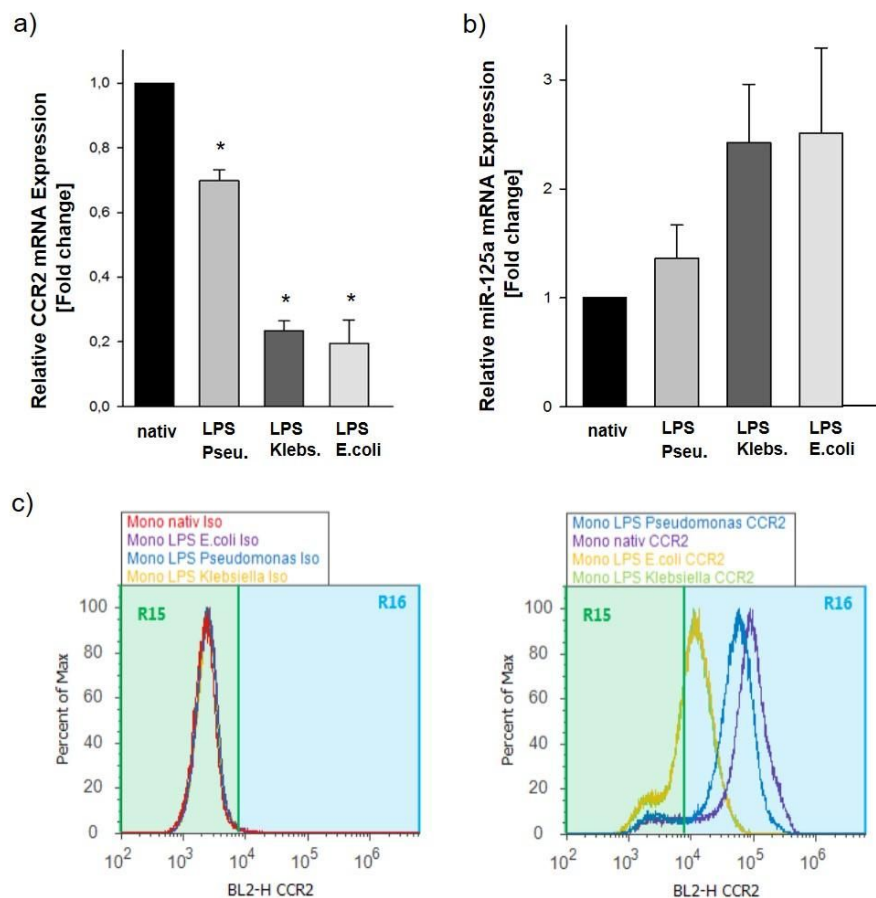


Abb. 27:

LPS reguliert je nach bakteriellem Serotyp die CCR2 (mRNA und Protein)- und miR-125a-Expression in humanen Monozyten

Frisch isolierte humane Monozyten wurden mit 0,5 ng/mL LPS aus *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* für 3,5 Stunden inkubiert. Es wurde anschließend die CCR2-mRNA- und miR-125a-Expression sowie die Proteinexpression untersucht.

- Die Regulation der CCR2-mRNA-Expression zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom bakteriellen Serotypen. Mittelwert \pm SEM, $n = 3$, * $p < 0,01$
- miR-125a wird abhängig vom bakteriellen Serotypen induziert. Mittelwert \pm SEM, $n = 3$, n.s.
- Die stimulierten Monozyten wurden geerntet und nach Fc-Rezeptor-Block mit einem PE-Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper gegen den CCR2 gefärbt. Dargestellt ist eine repräsentative Isotypen- (links) und CCR2-Färbung (rechts) von insgesamt drei unabhängigen Messungen.

4.10. Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen führt zur Induktion der miR-125a

Monozyten im inflammatorischen Milieu differenzieren sich unter dem Einfluss von Zytokinen aus. Daher sollte eine mögliche Regulation durch M-CSF, welches die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen triggert, untersucht werden. Monozyten wurden dafür aus dem Blut gesunder Spender isoliert und für sechs Tage mit M-CSF ausdifferenziert. Hier zeigte sich eine fast vollständige Reduktion des CCR2 um $97 \pm 1,9 \%$, bei 18 -facher $\pm 4,7$ Induktion der miR-125a.

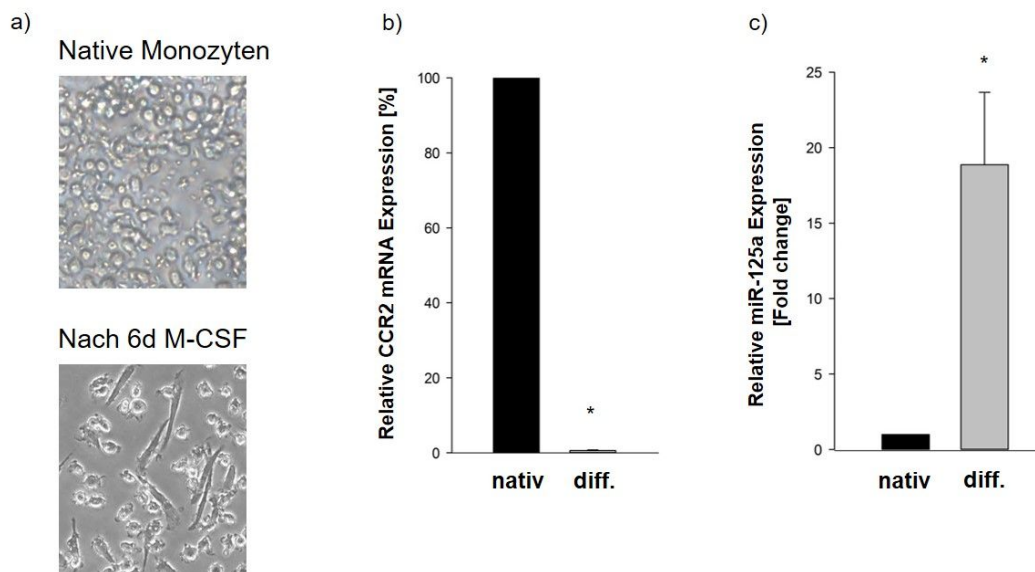


Abb. 28:

Ausdifferenzierung von primären humanen Monozyten zu Makrophagen reguliert die CCR2-mRNA- und miR-125a-Expression

- Repräsentativer Ausschnitt einer lichtmikroskopischen Aufnahme nativer Monozyten und sechs Tage nach Ausdifferenzierung zu Makrophagen mittels M-CSF. Vergrößerung 100x.
- CCR2-mRNA-Expression in Makrophagen. Die Ausdifferenzierung erfolgte aus frisch isolierten humanen Monozyten über sechs Tage mittels Stimulation mit M-CSF. Mittelwert \pm SEM, $n = 5$, * $p < 0,01$
- Induktion der miR-125a-Expression in Makrophagen. Mittelwert \pm SEM, $n = 3$, * $p < 0,01$

Bei JAM-L ließ sich eine Reduktion der mRNA-Expression, ähnlich der des CCR2, beobachten: M-CSF hatte eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression um $77 \pm 2,0$ % zur Folge.

Überraschenderweise verhielt sich JAM-A hingegen in der Differenzierung gegensätzlich, als dass sich hier nach sechs Tagen Ausdifferenzierung mit M-CSF hier eine signifikante Induktion von $38 \pm 15,0$ % zeigte.

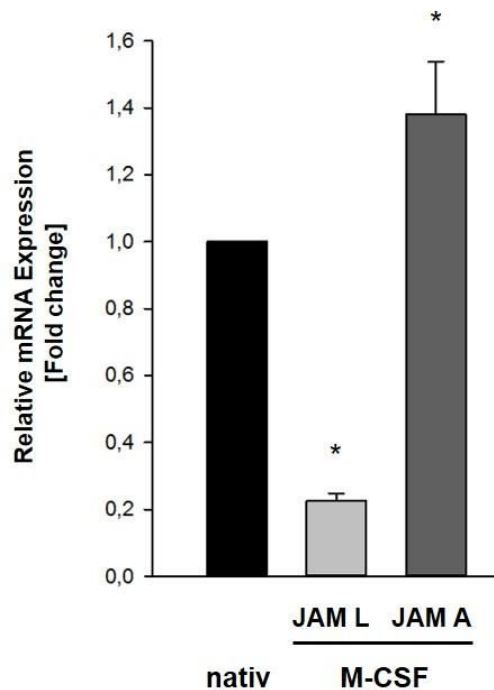


Abb. 29:

Ausdifferenzierung von primären humanen Monozyten zu Makrophagen mittels M-CSF führt zur Reduktion der JAM-L-, aber Induktion der JAM-A-mRNA-Expression

JAM-L- bzw. JAM-A-mRNA-Expression in ausdifferenzierten Makrophagen (Inkubation von humanen Monozyten mit M-CSF für 6 Tage). Mittelwert \pm SEM, $n=4$, JAM-A: * $p < 0,05$, JAM-L: * $p < 0,05$)

4.11. miR-125a wird in der Frühphase der Sepsis vermindert exprimiert und korreliert mit induzierten Zielgen-Expressionen

Im Rahmen inflammatorischer Krankheitsbilder, wie der Sepsis, kommt es zu einer inadäquaten Immunreaktion. Da gezeigt werden konnte, dass die Überexpression der miR-125a in Monozyten durch die Zielgene CCR2, JAM-A und JAM-L zu einer verminderten Adhäsion und Migration führt, sollte durch mRNA-Expressions-Bestimmungen aus Vollblut-Proben von Patienten in der Frühphase der Sepsis ($n=34$, Blutabnahme erfolgte bis

zwei Stunden nach Diagnosestellung) und Kontrollprobanden (n=13) eine mögliche klinische Relevanz evaluiert werden.

Tab. 4: Durchschnittliches Alter der Probanden in Jahren (Mittelwert \pm SEM)

<u>Gesund</u>	<u>Sepsis</u>
78 \pm 2,3	77 \pm 1,9

Mittels TaqMan-Assay wurde zunächst die Expression der miR-125a bestimmt. Es zeigte sich hierbei, dass Sepsis-Patienten im Gegensatz zu den Kontrollprobanden eine signifikante Reduktion in der miR-125a-Expression um $43 \pm 12,0$ % aufweisen.

Aufgrund der in den vorherigen Abschnitten gezeigten funktionellen Zusammenhänge sollte evaluiert werden, ob die verminderte miR-125a-Expression mit der mRNA-Expression der Zielgene CCR2, JAM-A und JAM-L korreliert. Es bestätigte sich diese Hypothese: JAM-L wies eine 1,6-fache \pm 0,1 Induktion auf, CCR2 wurde 2,5-fach \pm 0,4 und JAM-A 1,4-fach \pm 0,1 vermehrt exprimiert.

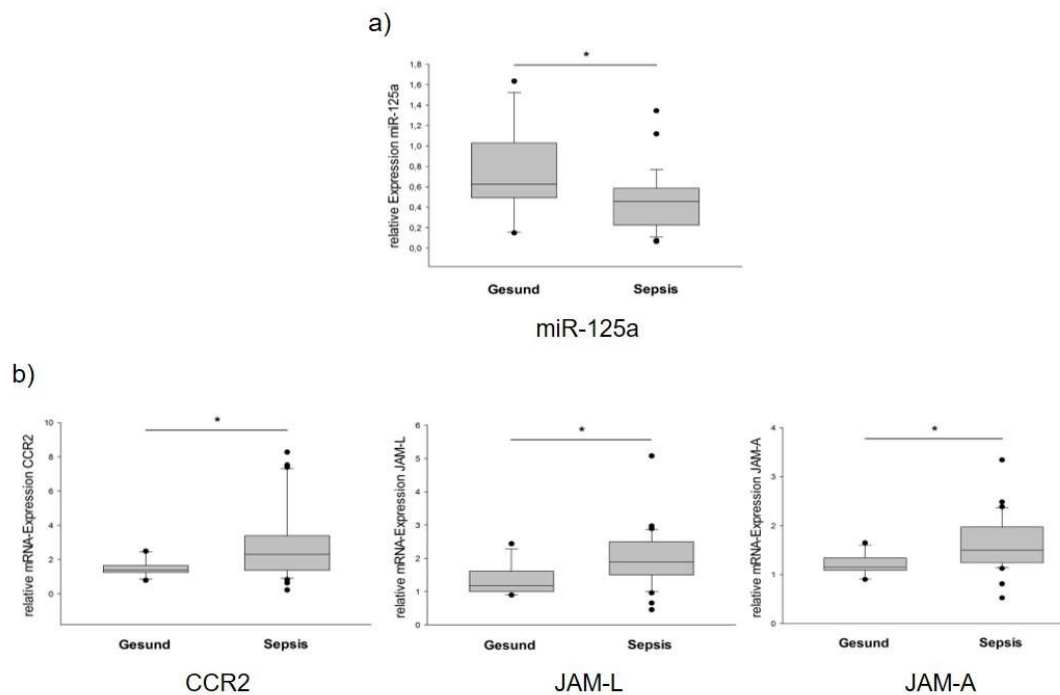


Abb. 30:

Expression von miR-125a und der Zielgene CCR2, JAM-L und JAM-A in Vollblut-RNA (PAXGene) von Sepsis-Patienten

RNA wurde aus Vollblut (PAXGene) von 34 Patienten in der „Frühphase“ der Sepsis extrahiert („Sepsis“). Sämtliche Expressionen wurden relativ zu Vollblut-RNA gesunder Spender desselben Altersdurchschnittes abgebildet („Gesund“).

- Dargestellt ist die Reduktion der miR-125a-Expression bei Sepsis-Patienten. Mittelwert \pm SEM, $n = 34$, $* p < 0,05$
- Die mRNA-Expression der Zielgene CCR2, JAM-L und JAM-A wurde mittels spezifischer qPCR Assays bestimmt. Mittelwert \pm SEM, $n = 34$, CCR2: $* p < 0,05$, JAM-L: $* p < 0,05$, JAM-A: $* p < 0,01$

5. Diskussion

Die Sepsis und das akute Lungenversagen sind schwerwiegende, lebensbedrohliche Erkrankungen. Trotz neuer Erkenntnisse der biomedizinischen Forschung konnte die Letalität bisher nicht reduziert werden^{59,60}. Interindividuelle Unterschiede der Patienten erschweren die Entwicklung prognostischer, auf biomolekularen Markern basierender Modelle.

Durch ihre vielfältige Rolle in der Immunreaktion nehmen Monozyten einen hohen Stellenwert im Krankheitsverlauf der Sepsis ein⁶¹. Ihre Rekrutierung in das entzündete Gewebe ist abhängig von Chemokinen, die als Reaktion auf Erreger freigesetzt werden.

Änderungen in der Expression pro- und antiinflammatorischer Chemokine beeinflussen das Verhalten von Monozyten, die aufgrund ihrer Rezeptorkonfiguration sensitiv auf Schwankungen der Chemokinhomöostase reagieren⁶². Eine besondere Rolle spielt das Chemokin CCL2 mit seinem Rezeptor CCR2, der auf klassischen CD14⁺⁺CD16⁻ CCR2⁺⁺ Monozyten stark exprimiert ist. Ein lokalisierter inflammatorischer Stimulus führt zu einer vermehrten CCL2-Sekretion durch eingewanderte PMN und ortsständige Immunzellen (Makrophagen und Lymphozyten). Die Änderung der CCL2-Konzentration wird durch den Rezeptor CCR2 auf klassischen Monozyten registriert. Diese wandern entlang des Konzentrationsgradienten und migrieren in das betroffene Gewebe.

miRNAs sind als epigenetische Masterregulatoren in der Pathogenese von Erkrankungen etabliert und auch unter dem Aspekt zukünftig möglicher therapeutischer Interventionen interessant^{63,64}. Der Einfluss von miRNAs auf die Chemokinhomöostase durch epigenetisches Silencing proinflammatorischer Zytokine konnte schon mehrfach gezeigt werden⁶⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob der Chemokinrezeptor CCR2 durch miRNAs reguliert wird und inwiefern die Monozytenfunktionen dadurch beeinflusst werden. Anschließend evaluierten wir die klinische Relevanz am Krankheitsbild der Sepsis.

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurde zunächst der Einfluss von miRNAs auf den CCR2 durch Interaktionsvorhersage ermittelt. Dafür wurde mithilfe der webbasierten bioinformatischen Vorhersageplattform TargetScan die 3'-UTR des CCR2-mRNA-Transkripts auf mögliche Interaktionen mit miRNAs untersucht. TargetScan ist ein öffentlicher Web Server, der die 3'-UTR auf komplementäre Basen zu den sogenannten Seed-Regionen (Basen 2–8 der reifen miRNA-Sequenz) der unterschiedlichen miRNAs untersucht. Es gibt bislang keine andere Möglichkeit, die Interaktion einer miRNA mit der 3'-UTR eines Transkriptes im Hochdurchsatzverfahren zu beweisen. Die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion kann mittels Berechnung der freien Bindungsenergie, der Anzahl an Bindungsstellen in der UTR und in der Nähe der 3'-UTR ebenfalls abgeschätzt werden^{66,67}. Von den zahlreichen möglichen Interaktionspartnern haben wir miR-125a aufgrund ihrer Sequenzcharakteristika, insbesondere aber auch wegen ihrer etablierten Rolle in der Inflammation^{68,69} als interessanten Regulator identifiziert. Sie ist ein Homolog zu lin-4 in *C. elegans*, der ersten bekannten microRNA. Zhao et al. (2010) konnten bereits zeigen, dass miR-125a in die inflammatorische Chemokinkaskade eingreift. RANTES ist ein Chemokin, das in inflammatorischen Prozessen vermehrt exprimiert ist und für die Rekrutierung von T-Zellen zu den inflammatorischen Arealen verantwortlich ist. miR-125a ist durch ihre Regulation von Krüppel-Like Factor 13 (KLF-13) in eine regulatorische Rückkopplung involviert, die die Induktion des inflammatorischen Chemokins RANTES in T-Zellen kontrolliert^{69,70}. Eine andere Studie beschreibt, dass miR-125a A20 und MAVS (Mitochondrial Antiviral Signaling) reguliert. A20 ist ein wichtiger negativer Regulator der NFkB-Aktivierung, der eine überschießende Expression inflammatorischer, nicht aber antiviraler Zytokine

verhindert. MAVS ist ein Mitochondrien-gebundenes Protein, das nach Erkennung eines Virus durch den zytoplasmatischen RIG-I-Rezeptor (RIG-I = Retinoic Acid-Inducible Gene I) eine antivirale Signalkaskade mittels IFN-Gen-Transkription startet. Eine miR-125a-Überexpression, wie sie z. B. in bronchialen Epithelzellen bei Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) beschrieben ist, führte bei einer viralen Infektion daher zu einer unverhältnismäßigen Hyperinflammation durch die reduzierte A20-Expression bei einer inadäquaten antiviralen Immunreaktion durch die Regulation von MAVS^{71,72}.

Um eine mögliche Regulation des CCR2 durch miR-125a zu untersuchen, transfizierten wir THP-1-Zellen, eine etablierte monozytäre Zelllinie, mit miR-125a und bestimmten die CCR2-Expression. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnte nach miR-125a-Überexpression eine signifikante Herunterregulation des CCR2 beobachtet werden. Diese Ergebnisse wurden anschließend in primären humanen Monozyten validiert. Auch hier zeigte sich nach transienter Transfektion von miR-125a auf mRNA- wie auch auf Proteinebene reproduzierbar eine signifikante Verminderung der CCR2-Expression.

Dieser Effekt wäre sowohl durch eine direkte Interaktion von miR-125a mit der 3'-UTR des Zieltranskripts erklärbar als auch durch eine indirekte Regulation, bei der die miRNA beispielsweise die Expression eines Transkriptionsfaktors für das CCR2-Gen beeinflusst.

Die direkte Regulation kann mithilfe eines Luciferase-Reporter-Gen-Assays experimentell validiert werden. Hierfür wird die 3'-UTR der CCR2-mRNA mit den putativen miR-125a-Bindestellen in die Multiple Cloning Site eines Reportervektors kloniert, der für zwei unterschiedliche Luciferasen kodiert. Hier konnten wir eine Reduktion der relativen Luciferase-Aktivität feststellen und so beweisen, dass miR-125a CCR2 direkt regulieren kann. Mittels Punktmutationen in den zwei vorhergesagten Bindestellen für miR-125a im

CCR2-3'-UTR konnten wir im Luciferase-Assay die Regulation über diese beiden Sequenzen bestätigen.

Als Nächstes wurde untersucht, ob die molekulare Interaktion des CCR2-Transkripts mit der miR-125a eine funktionelle Bedeutung für Monozyten im Kontext der Inflammation hat. Der CCR2 registriert Veränderungen der Chemokinhomöostase im Organismus und veranlasst die Monozyten zur Migration⁷³. Aus Mausmodellen mit Peritonitis weiß man, dass ein CCR2-Knockout eine gestörte Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen zum Infektionsherd zur Folge hat⁷⁴.

Daher sollte untersucht werden, ob sich eine Überexpression von miR-125a auf die Migration auswirkt. Um das Migrationsverhalten von Monozyten nach Transfektion mit miR-125a zu untersuchen, führten wir zunächst ein statisches Migrationsexperiment mithilfe der Boyden-Kammer durch. Die Boyden-Kammer bietet eine kostengünstige, schnelle und in der Handhabung vergleichsweise einfache Methode, um die Migration von Zellen zu untersuchen. Sie ist so konzipiert, dass durch den Aufbau eines Chemokin-Konzentrationsgradienten über zwei Kompartimente die Situation eines entzündeten Areals im Organismus simuliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass nach miR-125a-Überexpression eine signifikant verminderte Migration von Monozyten aus dem oberen Kompartiment hin zum CCL2 im unteren Kompartiment stattfindet.

Ein entscheidender Mangel dieser Methode ist allerdings, dass CCL2 mittelfristig vom unteren in das obere Kompartiment diffundiert, wodurch der Konzentrationsunterschied mit zunehmender Messdauer stetig abnimmt. Das Konzentrationsgefälle der Chemokine im Organismus bleibt hingegen bis zum Abklingen der Entzündung stabil.

Einen stabilen Konzentrationsgradienten erreicht man lediglich in der deutlich aufwändigeren, echtzeitmikroskopischen Untersuchung der Migration, bei der die

transfizierten Monozyten in eine 3D-Matrix gegossen und anschließend für sechs Stunden einem Konzentrationsgradienten ausgesetzt werden. In 60-Sekunden-Intervallen werden an den voreingestellten Positionen Aufnahmen der Zellen in der Matrix gemacht, wodurch ein Film entsteht, der die Zellbewegung aufzeigt. Auf diese Weise wird die Migration aufgrund eines Inflammationszustandes im Körper imitiert. Hier konnten wir demonstrieren, dass die Überexpression von miR-125a zum völligen Verlust der gerichteten Migration von Monozyten führte.

miRNAs besitzen zahlreiche Zielgene und sind der Knotenpunkt regulatorischer Netzwerke. Scott et al. konnten bereits zeigen, dass miR-125a über die direkte Regulation von erb-B2 Rezeptor Tyrosin Kinase- (ERBB2) und erb-B2 Rezeptor Tyrosin Kinase 3- (ERBB3)-Transkripten die Invasions- und Migrationskapazität einer humanen Brustkrebszelllinie (SKBR3-Zellen) reduziert ⁷⁵. Ebenfalls in humanen Brustkrebszelllinien konnten Guo et al. zeigen, dass eine direkte Regulation von HuR-Transkripten durch miR-125a unter anderem auch zu einer verminderten Migration der Brustkrebszellen führte. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine veränderte miR-125a-Expression auch im Rahmen der Inflammation zu einer insuffizienten Migration führt^{69,75,76}.

Anschließend wurde untersucht, ob der Verlust der gerichteten Migration durch eine verminderte CCR2-Expression hervorgerufen wird. Dafür wurde ein transienter Gen-Knockdown durch eine spezifische siRNA gegen den CCR2 durchgeführt. Im Falle einer Bestätigung unserer Hypothese müsste die gerichtete Inhibition des CCR2 einen vergleichbaren Effekt auf die monozytäre Migration aufweisen wie die Transfektion der miR-125a. Der spezifische CCR2-Knockdown führte auch tatsächlich zu einer gestörten Migration von Monozyten.

Eine miRNA ist aufgrund ihrer kurzen Basenabfolge und Zielsequenz komplementär zu verschiedenen mRNA-Sequenzen und kann somit die Aktivität vieler Gene regulieren⁷⁷.

miRNAs regulieren ganze Netzwerke und somit auch weitere Transkripte im Transkriptom des Zielgens. Deshalb wurden transfizierte Monozyten über eine transkriptomweite Expressionsanalyse untersucht, um das zugrunde liegende Regulationsnetzwerk der miR-125a zu identifizieren. Monozyten, die mit miR-125a bzw. mit einer Negativkontrolle transfiziert wurden, wurden dafür mittels Affymetrix GeneChip® Prime View™ Human Gene Expression Array auf differenziell exprimierte Gene evaluiert.

In der sich anschließenden Pathway-Analyse wurden vier besonders stark regulierte Signalwege identifiziert, die eine Rolle bei der monozytären Adhäsion spielen. Aufgrund der bereits beobachteten gestörten Migration war dieses Ergebnis von besonderem Interesse, da eine gerichtete Migration von Zellen und deren folgende Adhäsion und Transmigration im Rahmen der Immunantwort essenziell ist. Die differenziell exprimierten Gene wurden auf eine mögliche Regulation durch miR-125a hin untersucht. Nach transienter Transfektion von miR-125a konnten wir bei fünf Genen (*FLT3*, *VSIG4*, *ABCC4*, *JAM-A*, *JAM-L*) eine signifikante posttranskriptionelle Regulation durch miR-125a zeigen. Eine deutliche Regulation zeigte sich bei den junktionalen Adhäsionsmolekülen JAM-A und JAM-L, zwei Vertretern der Superimmunglobulin-Familie. Sie sind auf Monozyten exprimiert, aber auch als Transmembranproteine, neben den Occludinen und Claudinen, in den Tight Junctions lokalisiert, wo sie bei der transendothelialen Migration von Monozyten eine Rolle spielen⁷⁸.

Tab. 5:

Zielgene der miR-125a und ihre beschriebenen Aufgaben

Protein	Gen-name	Funktion	Migrationsbezug	Literatur
fms related Tyrosine Kinase 3	FLT3	Klasse III Rezeptor Tyrosinkinase, reguliert Hämatopoiese	migratorisch aktive CD103 ⁺ dendritische Zellen (DC) entstehen FLT3-FLT3L-abhängig aus dem DC-Vorgänger (CDP), wohingegen FLT3-unabhängige DC migratorisch nicht aktiv sind	⁷⁹
V-set and immunoglobulin domain containing 4	VSIG4 (Z39lg)	Negativer Regulator von T-Zell-Antworten, Rezeptor der Komplement-Komponenten C3b und iC3b	VSIG4 auf Makrophagen bei synovialer rheumatoider Arthritis induziert IL-8, welches die Migration von Leukozyten fördert	⁸⁰

ATP binding Cassette Subfamily C Member 4	ABCC4 (MRP4)	Mitglied der ABC-Transporter Superfamilie, involviert in zelluläre Detoxifikation	Fibroblasten migrieren ABCC4-vermittelt	81
Junctional Adhesion Molecule A	JAM-A (F11R)	Mitglied der Immunoglobulin Superfamilie, involviert in Leukozytentransmigration	JAM-A vermittelt durch Interaktion mit LFA-1 die Transmigration von Leukozyten	81,82
Junctional Adhesion Molecule Like	JAM-L	Involviert in Leukozytentransmigration	Blockade von JAM-L auf Monozyten und CD8 ⁺ T-Zellen verhindert deren Migration in das zentrale Nervensystem (ZNS)	83

Die junctionalen Adhäsionsmoleküle sind durch zwei Immunglobulinketten (Membran-distal V_H-Typ und Membran-proximal C₂-Typ) in der extrazellulären Domäne gekennzeichnet^{78,84}. Das erste junctionale Adhäsionsmolekül, das im Bereich der Tight Junctions von Epithel- sowie Endothelzellen entdeckt wurde, ist JAM-A (früher auch JAM-1, 106-Antigen oder

F11R). Es folgte die Identifizierung von vier weiteren junktionalen Adhäsionsmolekülen: JAM-B, JAM-C, JAM-4 und JAM-L.

Durch seine Expression auf Endothel- und Epithelzellen, aber auch auf zirkulierenden Zellen wie Blutplättchen, Monozyten, Lymphozyten, Neutrophilen und antigenpräsentierenden Zellen ist JAM-A das im Gefäßsystem am weitesten verbreitete junktionale Adhäsionsmolekül⁸⁴. JAM-L (Junctional Adhesion Molecule-Like) ist das jüngste Mitglied in der JAM-Familie. Während die Expression auf vaskulären Endothel- oder Epithelzellen gering ist, findet man eine starke Expression auf Monozyten und Neutrophilen.

Frühere Studien zeigten bereits, dass JAM-A durch miRNAs reguliert wird. So ist z.B. miR-145 durch ihr Ziel JAM-A auf Leukozyten und Endothelzellen an der Regulation der Tight Junction-Proteine im Rahmen der epithelialen und endothelialen Barrierefunktion beteiligt⁸⁵.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die beobachtete Regulation der JAM-A- und JAM-L-mRNA-Expression tatsächlich durch eine direkte Regulation der 3'-UTRs durch miR-125a vermittelt wird. Zur experimentellen Validierung wurde jeweils die JAM-A- bzw. JAM-L-3'-UTR mit den putativen miR-125a-Bindestellen in die Multiple Cloning Site eines Reportervektors kloniert und ein Luciferase-Assay durchgeführt. Nach Cotransfektion des Reporterkonstrukts und miR-125a zeigte sich eine Reduktion der relativen Luciferase-Aktivität. JAM-A und JAM-L konnten so als Zieltranskripte der miR-125a durch direkte Bindung an ihre 3'-UTR identifiziert werden.

JAM-A und JAM-L, aber auch der CCR2 sind für die Adhäsion von Monozyten essenziell^{82,83,86,87}. Der CCR2 vermittelt dabei den ersten Kontakt der Monozyten mit dem Endothel durch endothelial gebundenes CCL2 und die Aktivierung der Monozyten. JAM-A und JAM-L sind bei der anschließenden Transmigration essenziell. Der phänotypische

Einfluss der direkten Regulation durch miR-125a sollte daher in Adhäsionsstudien untersucht werden. Dafür wurden Endothelzellen aus der Nabelschnur nach Sectio caesarea isoliert und unter Flussbedingungen kultiviert. Um ein inflammatorisches Endothel zu simulieren, wurde das Endothel vor Versuchsbeginn mit $\text{TNF-}\alpha$ aktiviert, anschließend wurden die transfizierten, Calcein-gefärbten Monozyten darüber perfundiert. Es zeigte sich eine deutlich verminderte monozytäre Adhäsion nach miR-125a-Transfektion. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt durch JAM-A, JAM-L und CCR2 hervorgerufen wird, führten wir einen spezifischen Gen-Knockdown mithilfe von siRNAs durch, die gegen JAM-A, JAM-L oder CCR2 gerichtet sind. Es bestätigte sich, dass ein spezifischer JAM-A-, JAM-L- oder CCR2-Knockdown eine verminderte Adhäsion von Monozyten zur Folge hat.

Das bedeutet, dass miR-125a nicht nur die Chemotaxis von Monozyten durch die Regulation der CCR2-Expression, sondern auch ihre Adhäsion durch Regulation der Expression von CCR2, JAM-A und JAM-L koordiniert. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Rekrutierung von Monozyten im Rahmen der Inflammation multimodal durch miR-125a kontrolliert wird.

Nachdem die funktionelle Relevanz der miR-125a-Interaktionen im Rahmen der Migration und Adhäsion gezeigt werden konnte, untersuchten wir einen möglichen Einfluss des inflammatorischen Milieus auf den miR-125a-Expressionslevel in Monozyten. Es wurde bereits demonstriert, dass rekrutierte Monozyten im inflammatorischen Areal den CCR2 herunterregulieren und sich dort zu Makrophagen ausdifferenzieren^{88,89}.

Sica et al. haben bereits 1997 beschrieben, dass der CCR2 auf Monozyten durch LPS herunterreguliert wird, wohingegen eine Chemokin-Stimulation der Monozyten mittels CCL2 keinen Effekt auf die CCR2-Expression zeigte⁹⁰. Es sollte daher untersucht werden, ob die verminderte Expression des CCR2 im inflammatorischen Areal möglicherweise auf eine Induktion der miR-125a-Expression zurückzuführen ist. In mit LPS stimulierten Monozyten

konnten wir beobachten, dass die miR-125a signifikant induziert wird und es in der Folge zu einer Reduktion der CCR2-mRNA-Expression kommt.

Bakterielles LPS reduziert schon in geringer Konzentration die CCR2-Expression auf mononukleären Phagozyten deutlich, mit kompletter Suppression ab einer Konzentration von 10 ng/mL LPS. Die CCR1- und CCR5-Expression wird ebenfalls signifikant vermindert, jedoch nicht annähernd so stark wie die des CCR2⁹⁰. Es wird spekuliert, dass die verschiedenen Effekte proinflammatorischer Signale auf Agonisten und ihre Rezeptoren dazu dienen, die mononukleären Phagozyten am Ort der Inflammation zu binden, eine reverse Transmigration zu verhindern und eine exzessive Rekrutierung weiterer Zellen zu unterbinden⁹⁰. Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit denen von Sica et al. Auch wir konnten zeigen, dass LPS den monozytären CCR2 supprimiert. Die Autoren desselben Papers folgern, dass die nukleäre Transkriptionsrate des CCR2 nicht durch LPS inhibiert wird, sondern dass eine AU-reiche 3'-UTR zu einer kürzeren mRNA-Halbwertszeit führt. Unsere Ergebnisse fügen eine weitere Erklärung für diese Beobachtung hinzu: Durch LPS wird miR-125a in Monozyten induziert, was posttranskriptionell die Translation der CCR2-mRNA unterbindet. Unsere Experimente zeigten, dass der Anstieg der miR-125a auch zu einer Herunterregulierung der Zielgene *JAM-A* und *JAM-L* führt. Wir führen diese Regulation auf eine vermehrte Sesshaftigkeit der Monozyten zurück: Durch die Induktion der miR-125a im Monozyten wird er für chemotaktische Stimuli über den CCR2 unempfindlich gemacht. Gleichzeitig wird der Kontakt des Monozyten zum Endothel und eine weitere Stimulation über endothelial gebundenes CCL2 inhibiert.

Der Makrophagenkolonien stimulierende Faktor (M-CSF), ein Zytokin, das im inflammatorischen Areal zur Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen führt, induzierte ebenfalls miR-125a und führte dadurch ebenfalls zur Reduktion der CCR2-Expression.

Basierend auf unseren Ergebnissen würde man erwarten, dass eine Stimulierung mit M-CSF ebenfalls eine verminderte Expression von JAM-A und JAM-L hervorruft. Überraschenderweise war hier jedoch zu beobachten, dass nur JAM-L wie erwartet nach sechstägiger M-CSF-induzierter Ausdifferenzierung vermindert exprimiert wurde. JAM-A hingegen zeigte eine signifikante Hochregulation. In der Literatur ist beschrieben, dass Monozyten im Rahmen der Differenzierung zu dendritischen Zellen JAM-A hochregulieren. Dies soll den Austritt durch das Endo- und Epithel über Interaktion mit deren JAM-A-Molekülen in den Tight Junctions ermöglichen⁹¹. Im Gegensatz zu Makrophagen, die ortsständig sind, handelt es sich bei dendritischen Zellen um spezialisierte migratorische antigenpräsentierende Zellen. Sie müssen daher auch nach ihrer Differenzierung chemotaktische und adhäsionsvermittelnde Rezeptoren erhalten, um zu den Lymphknoten wandern zu können und dort naive T-Zellen zu stimulieren^{92,93}. Dies ist bei Monozyten nicht der Fall und lässt darauf schließen, dass die Hochregulation von JAM-A auf Makrophagen für eine Effektorfunktion relevant ist, deren Zusammenhang bis heute noch nicht bekannt ist.

Eine Simulation inflammatorischer Bedingungen mittels CCL2-Stimulation führte in unseren Versuchen zu keiner veränderten CCR2-Expression bei ebenfalls unveränderter miR-125a-Expression und steht somit in Einklang mit den Ergebnissen von Sica et al.⁹⁰.

Interessanterweise weisen LPS von *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* im Gegensatz zu LPS von *Pseudomonas aeruginosa* eine deutlich höhere miR-125a-Induktion und CCR2-Repression auf. Die Struktur der Lipid-A-Region unterscheidet sich innerhalb verschiedener Bakterienspezies. Hoch endotoxisches LPS, das hexaacyliert und biphosphoryliert ist, findet sich bei *E. coli* und *K. pneumoniae*. *P. aeruginosa*-LPS ist hypoacyliert (Pentaacylierung) und führt im Vergleich zu LPS von *E. coli* und *K. pneumoniae* zu einer verminderten Entzündungsreaktion über TLR-4/MD-2^{94,95}. Unsere Ergebnisse der CCR2- und miR-125a-Expression bestätigen ein geringeres Ausmaß der Inflammation. Eine

Hypothese ist, dass die Regulation der miR-125a von einer Interaktion des Liganden mit TLR-4/MD-2 vermittelt ist, experimentelle Untersuchungen stehen aber noch aus.

Da gezeigt werden konnte, dass der CCR2 eine hohe Sensitivität sogar innerhalb Gram-negativer Bakterien aufweist, ist ein interessanter Aspekt, wie er sich bei Gram-positiven Bakterien verhält. Experimentelle Studien dazu stehen ebenfalls noch aus.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass miR-125a durch ihre Zieltranskripte CCR2, JAM-A und JAM-L die Adhäsionskaskade von Monozyten in ihren wesentlichen Schritten beeinflusst. Schon beim ersten Kontakt des Monozyten mit dem Endothel (CCR2) bis hin zur festen Bindung des Monozyten über JAM-L und JAM-A und zur anschließenden Transmigration (JAM-A) reguliert miR-125a das Verhalten der Monozyten. Wir konnten zeigen, dass eine Induktion der miR-125a eine verminderte Adhäsion der Monozyten zur Folge hat. Das umgebende Milieu reguliert miR-125a und fördert beim Monozyten die Adhäsionskaskade oder die Ortsständigkeit.

In Bezug auf die Sepsis ist in der Literatur bereits beschrieben, dass Monozyten von Verbrennungspatienten, die eine Sepsis entwickeln, eine höhere CCR2-Expression aufweisen, als Verbrennungspatienten ohne Sepsis. Der CCR2 wird daher als potenzieller Sepsis-Marker bei Verbrennungsopfen vorgeschlagen⁹⁶.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Expression der miR-125a und ihrer evaluierten Zieltranskripte in Proben von Patienten in der Frühphase der Sepsis untersucht. Die Gesamt-RNA und Gesamt-miRNA aus den 34 Patientenproben, die bis zwei Stunden nach Diagnosestellung entnommen wurden, sind mithilfe des PAXgene™ Blutentnahmeröhrchens isoliert. Anschließend haben wir sowohl den miR-125a-Expressionstatus sowie die CCR2-, JAM-L- und JAM-A-mRNA-Expression evaluiert.

Die Frühphase der Sepsis ist geprägt durch eine Hyperinflammation des Patienten, in der die Monozyten maximal mobil sind. Durch das inflammatorische Milieu wird der Monozyt zu einer hohen Adhäsionsbereitschaft getriggert. Wir konnten zeigen, dass in Leukozyten von Patienten im frühen Sepsis-Stadium die miR-125a reduziert wird, mit nachfolgender signifikanter Induktion ihrer Zieltranskripte. Durch eine vermehrte Expression von CCR2, JAM-A und JAM-L ist der Monozyt in der Lage, zu adhären und entzündetes Gewebe zu infiltrieren, um pathogene Keime zu bekämpfen. Die anfängliche Induktion der Zieltranskripte bei reduzierter miR-125a-Expression ist daher bei der Keimbekämpfung im Rahmen der Inflammation förderlich, im Gewebe selbst müsste dennoch eine Induktion der miR-125a und die dadurch bedingte Reduktion der Zieltranskripte folgen, um die Monozyten dort ansässig zu halten. Dies stellt sich als sehr interessanter Aspekt dar, der allerdings experimentell schwierig zu bearbeiten ist, da dafür die Generierung von Patientenproben schwieriger ist.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass miR-125a eine essenzielle Rolle im Rahmen der Immunantwort spielt. Insbesondere ließ sich eine deutliche Beteiligung bei der Reaktion auf Gram-negative Keime zeigen. Die Regulation der miR-125a im Rahmen der Immunantwort beeinflusst die monozytären Migrationseigenschaften durch Beeinflussung der direkten Zieltranskripte der miR-125a: CCR2, JAM-A und JAM-L. Die Induktion der miR-125a führt somit zur Sesshaftigkeit der Monozyten im inflammatorischen Gewebe, woraufhin sich diese ausdifferenzieren, pathogene Partikel phagozytieren oder Zytokine sezernieren können.

Im Rahmen der Sepsis kommt es zu einer inflammatorischen Überreaktion des Organismus und, wie unsere Ergebnisse darlegen, zu einer Reduktion der miR-125a-Expression bei Induktion der Zieltranskripte CCR2, JAM-L und JAM-A. Um die Hypothese eines direkten Zusammenhangs zwischen miR-125a und der inflammatorischen Überreaktion im Rahmen der Sepsis zu validieren, sind größere Fallzahlen essenziell.

Des Weiteren ist interessant, wie sich miR-125a nach Stimulation mit unterschiedlichen Mikroorganismen verhält. Dies könnte im Rahmen einer Entzündung in der Mikrobiologie von enormer Wichtigkeit sein, da eine frühe Identifizierung des Keims gezielte therapeutische Maßnahmen ermöglicht. MiR-125a könnte hier als Biomarker fungieren.

6. Zusammenfassung

Monozyten spielen bei der Induktion und Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozesse, wie z.B. der Sepsis, eine zentrale Rolle. Sie gelangen durch Chemotaxis, endotheliale Adhäsion und Transmigration an den Ort der Inflammation. Dies wird maßgeblich durch Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle vermittelt, wobei die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen noch weitgehend unbekannt sind.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass miR-125a den Chemokinrezeptor 2 (CCR2) reguliert und auf diese Weise die monozytäre Chemotaxis beeinflusst. Eine Expressionsanalyse des Transkriptoms miR-125a-transfizierter Monozyten identifizierte die junktionalen Adhäsionsmoleküle JAM-A und JAM-L als weitere Zielgene. Untersuchungen der Adhäsionseigenschaften zeigten, dass miR-125a durch die Regulation der drei Zielgene CCR2, JAM-A und JAM-L die endotheliale Adhäsion von Monozyten vermindert.

Es konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass die Expression von miR-125a in Monozyten über das umgebende Milieu reguliert wird; so hat z. B. die Simulation eines inflammatorischen Milieus mittels LPS-Stimulation eine Induktion der miR-125a mit konsekutiver Herunterregulation ihrer Zielgene zur Folge. Die Induktion der miR-125a führt somit zur Sesshaftigkeit der Monozyten im inflammatorischen Gewebe, woraufhin sich diese ausdifferenzieren, pathogene Partikel phagozytieren oder Zytokine sezernieren können.

Zur Evaluation der klinischen Relevanz wurde Vollblut-RNA von Patienten mit der Diagnose "Sepsis" (Frühphase, bis maximal zwei Stunden nach Diagnosestellung) und von gesunden Probanden extrahiert und die Expression von CCR2, JAM-A, JAM-L und miR-125a mittels qPCR bestimmt. Es zeigte sich, dass Sepsis-Patienten eine Reduktion der miR-125a-Expression aufweisen bei Induktion der Zieltranskripte CCR2, JAM-A und JAM-L.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass miR-125a in der Immunantwort eine zentrale Rolle spielt. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, ließ sich eine deutliche Beteiligung bei der Reaktion auf Gram-negative Keime zeigen. Diese Ergebnisse könnten klinisch im Rahmen der Diagnostik hyperinflammatorischer Erkrankungen genutzt werden.

7. Summary

Monocytes play a crucial role in the induction but also maintenance of an inflammation, for example sepsis. Chemokines and their receptors coordinate their chemotaxis, endothelial adhesion and transmigration, in order to reach the inflamed area. The underlying regulatory mechanisms are yet to be defined.

We were able to show that miR-125a directly regulates chemokine receptor 2 (CCR2), thereby affecting chemotaxis of monocytes. An expression-analysis of the whole transcriptome of miR-125a-transfected monocytes identified JAM-A and JAM-L as further target genes. Validating the adhesion of monocytes, we were able to show that miR-125a decreases endothelial adhesion through direct targeting of CCR2, JAM-A and JAM-L.

The expression of miR-125a in monocytes is regulated by the surrounding environment, e.g. stimulation of monocytes with LPS leads to an induction of miR-125a and consecutive downregulation of its target genes. This leads monocytes to settle down at the inflamed area, differentiating into macrophages, phagocytosing pathogens or secreting cytokines. Therefore, we were able to identify miR-125a as a crucial player in the immune response.

Evaluating the clinical impact, we extracted whole-blood RNA from patients with “Sepsis” (early phase, samples were taken until max. 2 hours after the onset) and healthy volunteers and determined the expression of CCR2, JAM-A, JAM-L and miR-125a using qPCR. In this study we showed that patients with sepsis have a reduced miR-125a expression level which leads to an upregulation of its target genes CCR2, JAM-A and JAM-L.

We conclude that miR-125a plays a pivotal role in the immune response and shows a notable reaction on gram-negative bacteria. These findings could be useful within the context of diagnostic analysis of hyperinflammatory diseases.

8. Literaturverzeichnis

1. Serbina, N. V. & Pamer, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* **7**, 311–317 (2006).
2. van Furth, R. THE ORIGIN AND KINETICS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES. *J. Exp. Med.* **128**, 415–435 (1968).
3. Yona, S. & Jung, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr. Opin. Hematol.* **17**, 53–59 (2010).
4. Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F. & Wang, H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* **2**, 1 (2014).
5. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**, 445–455 (2013).
6. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 762–774 (2011).
7. Tracey, K. J. The inflammatory reflex. *Nature* **420**, 853–859 (2002).
8. Scott, A., Khan, K. M., Cook, J. L. & Duronio, V. What is ‘inflammation’? Are we ready to move beyond Celsus? *Br. J. Sports Med.* **38**, 248–249 (2004).
9. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* **420**, 846–852 (2002).
10. The Immune System (First of Two Parts). *N. Engl. J. Med.* **343**, 1132–1132 (2000).
11. Singer, M. The new sepsis consensus definitions (Sepsis-3): the good, the not-so-bad, and the actually-quite-pretty. *Intensive Care Med.* **42**, 2027–2029 (2016).
12. Serhan, C. N. & Petasis, N. A. Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution. *Chem. Rev.* **111**, 5922–5943 (2011).

13. Salomao, R. *et al.* Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. *Shock* **38**, 227–242 (2012).
14. Osuchowski, M. F., Welch, K., Siddiqui, J. & Remick, D. G. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J. Immunol.* **177**, 1967–1974 (2006).
15. Ware, L. B. & Matthay, M. A. The acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1334–1349 (2000).
16. Maus, U. *et al.* Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **280**, L58–68 (2001).
17. Rosseau, S. *et al.* Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**, L25–35 (2000).
18. Fingerle, G. *et al.* The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* **82**, 3170–3176 (1993).
19. Moore, B. B. *et al.* Protection from Pulmonary Fibrosis in the Absence of CCR2 Signaling. *The Journal of Immunology* **167**, 4368–4377 (2001).
20. Yamamoto, T. *et al.* The role of leukocyte emigration and IL-8 on the development of lipopolysaccharide-induced lung injury in rabbits. *J. Immunol.* **161**, 5704–5709 (1998).
21. Leentjens, J., Kox, M., van der Hoeven, J. G., Netea, M. G. & Pickkers, P. Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 1287–1293 (2013).
22. Yona, S. & Jung, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr. Opin. Hematol.* **17**, 53–59 (2010).
23. Parker, L. C., Whyte, M. K. B., Vogel, S. N., Dower, S. K. & Sabroe, I. Toll-like receptor

- (TLR)2 and TLR4 agonists regulate CCR expression in human monocytic cells. *J. Immunol.* **172**, 4977–4986 (2004).
24. van Furth, R. *et al.* The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* **46**, 845–852 (1972).
 25. Strauss-Ayali, D., Conrad, S. M. & Mosser, D. M. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 244–252 (2007).
 26. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
 27. Thomas, G., Tacke, R., Hedrick, C. C. & Hanna, R. N. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1306–1316 (2015).
 28. Ingersoll, M. A., Platt, A. M., Potteaux, S. & Randolph, G. J. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol.* **32**, 470–477 (2011).
 29. Charo, I. F. & Ransohoff, R. M. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *N. Engl. J. Med.* **354**, 610–621 (2006).
 30. Rot, A. & von Andrian, U. H. Chemokines in Innate and Adaptive Host Defense: Basic Chemokinese Grammar for Immune Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 891–928 (2004).
 31. Zlotnik, A. & Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121–127 (2000).
 32. Rose, C. E., Jr, Sung, S.-S. J. & Fu, S. M. Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirculation* **10**, 273–288 (2003).
 33. Tanaka, S., Green, S. R. & Quehenberger, O. Differential expression of the isoforms for the monocyte chemoattractant protein-1 receptor, CCR2, in monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 73–80 (2002).
 34. O’Boyle, G., Brain, J. G., Kirby, J. A. & Ali, S. Chemokine-mediated inflammation: Identification of a possible regulatory role for CCR2. *Mol. Immunol.* **44**, 1944–1953

(2007).

35. Charo, I. F. & Peters, W. Chemokine receptor 2 (CCR2) in atherosclerosis, infectious diseases, and regulation of T-cell polarization. *Microcirculation* **10**, 259–264 (2003).
36. Maus, U. A. *et al.* CCR2-positive monocytes recruited to inflamed lungs downregulate local CCL2 chemokine levels. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **288**, L350–8 (2005).
37. Gerhardt, T. & Ley, K. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc. Res.* **107**, 321–330 (2015).
38. Dawar, F. U. *et al.* Updates in understanding the role of cyclophilin A in leukocyte chemotaxis. *J. Leukoc. Biol.* **101**, 823–826 (2017).
39. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74–80 (2010).
40. Imhof, B. A. & Aurrand-Lions, M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 432–444 (2004).
41. Muller, W. A. Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* **24**, 326–333 (2003).
42. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. *Immunologie*. (Spektrum Akademischer Verlag, 2005).
43. Johnson-Léger, C. & Imhof, B. A. Forging the endothelium during inflammation: pushing at a half-open door? *Cell Tissue Res.* **314**, 93–105 (2003).
44. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
45. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
46. Kreth, S., Hübner, M. & Hinske, L. C. MicroRNAs as Clinical Biomarkers and Therapeutic Tools in Perioperative Medicine. *Anesth. Analg.* (2017).

doi:10.1213/ANE.0000000000002444

47. Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N. & Shiekhattar, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* **123**, 631–640 (2005).
48. He, L. & Hannon, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 522–531 (2004).
49. Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. & Pesole, G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* **3**, REVIEWS0004 (2002).
50. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
51. Potenza, N. & Russo, A. Biogenesis, evolution and functional targets of microRNA-125a. *Mol. Genet. Genomics* **288**, 381–389 (2013).
52. Krek, A. *et al.* Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* **37**, 495–500 (2005).
53. Liu, J. *et al.* Elevated miR-155 expression induces immunosuppression via CD39 regulatory T-cells in sepsis patient. *Int. J. Infect. Dis.* **40**, 135–141 (2015).
54. Roderburg, C. *et al.* Circulating microRNA-150 serum levels predict survival in patients with critical illness and sepsis. *PLoS One* **8**, e54612 (2013).
55. Yang, K. *et al.* Changed profile of microRNAs in acute lung injury induced by cardio-pulmonary bypass and its mechanism involved with SIRT1. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 1104–1115 (2015).
56. Huber, W. *et al.* Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat. Methods* **12**, 115–121 (2015).
57. Irizarry, R. A. *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249–264 (2003).
58. Garcia, D. M. *et al.* Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of Isy-6 and other microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1139–1146

(2011).

59. Leentjens, J., Kox, M., van der Hoeven, J. G., Netea, M. G. & Pickkers, P.
Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 1287–1293 (2013).
60. Essandoh, K. & Fan, G.-C. Role of extracellular and intracellular microRNAs in sepsis. *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 2155–2162 (2014).
61. Salomao, R. *et al.* Bacterial Sensing, Cell Signaling, and Modulation of the Immune Response During Sepsis. *Shock* **38**, 227–242 (2012).
62. Charo, I. F. & Ransohoff, R. M. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *N. Engl. J. Med.* **354**, 610–621 (2006).
63. Sun, Y.-M., Lin, K.-Y. & Chen, Y.-Q. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J. Hematol. Oncol.* **6**, 6 (2013).
64. Kreth, S., Hübner, M. & Hinske, L. C. MicroRNAs as Clinical Biomarkers and Therapeutic Tools in Perioperative Medicine. *Anesth. Analg.* (2017).
doi:10.1213/ANE.0000000000002444
65. Kingsley, S. M. K. & Bhat, B. V. Role of microRNAs in sepsis. *Inflamm. Res.* **66**, 553–569 (2017).
66. Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U. & Segal, E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.* **39**, 1278–1284 (2007).
67. Hinske, L. C. *et al.* MiRIAD update: using alternative polyadenylation, protein interaction network analysis and additional species to enhance exploration of the role of intragenic miRNAs and their host genes. *Database* **2017**, (2017).
68. Essandoh, K., Li, Y., Huo, J. & Fan, G.-C. MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock* **46**, 122–131 (2016).

69. Potenza, N. & Russo, A. Biogenesis, evolution and functional targets of microRNA-125a. *Mol. Genet. Genomics* **288**, 381–389 (2013).
70. Zhao, X. *et al.* MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES levels via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **62**, 3425–3435 (2010).
71. Hsu, A. C.-Y. *et al.* MicroRNA-125a and -b inhibit A20 and MAVS to promote inflammation and impair antiviral response in COPD. *JCI Insight* **2**, (2017).
72. Wark, P., Hsu, A., Starkey, M. & Hansbro, P. Micro-RNA-125a/b target A20 and MAVS to promote inflammatory and impair antiviral responses in chronic obstructive pulmonary disease. in *3.2 Airway Cell Biology and Immunopathology* (2016).
doi:10.1183/13993003.congress-2016.pa4658
73. Serbina, N. V. & Pamer, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* **7**, 311–317 (2006).
74. Kurihara, T., Warr, G., Loy, J. & Bravo, R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J. Exp. Med.* **186**, 1757–1762 (1997).
75. Scott, G. K. *et al.* Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J. Biol. Chem.* **282**, 1479–1486 (2007).
76. Guo, X., Wu, Y. & Hartley, R. MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer. *RNA Biol.* **6**, 575–583 (2009).
77. Baek, D. *et al.* The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**, 64–71 (2008).
78. Bazzoni, G. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 525–530 (2003).
79. Nakano, H. *et al.* Migratory properties of pulmonary dendritic cells are determined by

- their developmental lineage. *Mucosal Immunol.* **6**, 678–691 (2013).
80. Lee, M.-Y. *et al.* Z39Ig is expressed on macrophages and may mediate inflammatory reactions in arthritis and atherosclerosis. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 922–928 (2006).
 81. Sinha, C. *et al.* PKA and actin play critical roles as downstream effectors in MRP4-mediated regulation of fibroblast migration. *Cell. Signal.* **27**, 1345–1355 (2015).
 82. Ostermann, G., Weber, K. S. C., Zernecke, A., Schröder, A. & Weber, C. JAM-1 is a ligand of the β 2 integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat. Immunol.* **3**, 151–158 (2002).
 83. Alvarez, J. I. *et al.* JAML mediates monocyte and CD8 T cell migration across the brain endothelium. *Annals of Clinical and Translational Neurology* **2**, 1032–1037 (2015).
 84. Weber, C., Fraemohs, L. & Dejana, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 467–477 (2007).
 85. Cichon, C., Sabharwal, H., Rüter, C. & Schmidt, M. A. MicroRNAs regulate tight junction proteins and modulate epithelial/endothelial barrier functions. *Tissue Barriers* **2**, e944446 (2014).
 86. Bazzoni, G. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 525–530 (2003).
 87. Maus, U. *et al.* Role of endothelial MCP-1 in monocyte adhesion to inflamed human endothelium under physiological flow. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H2584–91 (2002).
 88. Parker, L. C., Whyte, M. K. B., Vogel, S. N., Dower, S. K. & Sabroe, I. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists regulate CCR expression in human monocytic cells. *J. Immunol.* **172**, 4977–4986 (2004).
 89. Charo, I. F. & Peters, W. Chemokine receptor 2 (CCR2) in atherosclerosis, infectious diseases, and regulation of T-cell polarization. *Microcirculation* **10**, 259–264 (2003).
 90. Sica, A. *et al.* Bacterial Lipopolysaccharide Rapidly Inhibits Expression of C–C

- Chemokine Receptors in Human Monocytes. *J. Exp. Med.* **185**, 969–974 (1997).
91. Ogasawara, N. *et al.* Induction of JAM-A during differentiation of human THP-1 dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **389**, 543–549 (2009).
92. Ginhoux, F. & Jung, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 392–404 (2014).
93. Yona, S. & Jung, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr. Opin. Hematol.* **17**, 53–59 (2010).
94. Ernst, R. K. *et al.* Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **286**, 1561–1565 (1999).
95. Hajjar, A. M., Ernst, R. K., Yi, J., Yam, C. S. & Miller, S. I. Expression level of human TLR4 rather than sequence is the key determinant of LPS responsiveness. *PLoS One* **12**, e0186308 (2017).
96. Xiu, F., Stanojcic, M., Wang, V., Qi, P. & Jeschke, M. G. C-C Chemokine Receptor Type 2 Expression on Monocytes Before Sepsis Onset Is Higher Than That of Postsepsis in Septic Burned Patients: A New Predictor for Sepsis in Burned Injury. *Ann. Surg.* **264**, 392–398 (2016).

9. Material

9.1. Geräte

Attune™ Acoustic Focusing Cytometer	Applied Biosystems, Foster City, USA / Darmstadt, Deutschland
Autoklav DE-45	Systec, Wetztenberg
Axio Observer Z1	Carl Zeiss GmbH, Jena
Brutschrank Function Line (Zellkultur)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Brutschrank BD 115 (Bakterien)	Binder, Tuttlingen
BVC21 Vakuumsaugpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Camera Controller ORCA-ER	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Shizuoka Pref, Japan
Eppendorf Reference® Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage MP 300	Chyo Balance Corp., Kyoto, Japan
Gas Inkubationssystem Unit I	ibidi, Martinsried
Gel Doc 2000 Gel Documentation System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

Hera Safe Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
IX50 Invers Mikroskop	Olympus GmbH, Hamburg
Kompaktschüttler KS 15 Control mit Inkubationshaube	Edmund Buhler GmbH, Hechingen
Live Cell Imaging System 6 HT200	ibidi, Martinsried
Light Cycler® 480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Luminometer MicroLumat Plus	Berthold Technologie GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler pro S	Eppendorf AG, Hamburg
Microplate Reader MRX	Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, USA
Milli-Q Advantage A10 Water System	Merck Millipore, Billerica, USA
Mikroskop Modell IB	Optech Inc., Vaughan, Canada
Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Multifuge 3 S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau

NanoDrop ND-2000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neon™ Transfection System	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Pipetboy comfort	Integra Biosciences, Fernwald
PowerPac Basic Electrophoresis Power Supply Unit	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Pumpsystem mit rotem Perfusionssset (Durchmesser 1,6 mm)	ibidi, Martinsried
Sub-Cell GT Elektrophorese System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Ultrazentrifuge TGA-50	Hemotec, Gellerkirchen, Schweiz
Olympus U-RFL-T Fluoreszenz-Vorschaltgerät	Olympus GmbH, Hamburg
Eluator™ Vacuum Elution Device	Promega GmbH, Mannheim
Varifuge 3.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA
Vortexschüttler REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

Wasserbad SWB 25	Haake Technik GmbH, Vreden
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

9.2. Reagenzien

Acrylamid / Bisacrylamid 30%	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose Gel 6x Loading Dye	Amresco Inc., Solon, USA
Agarose Serva Tablets	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Attune™ Focusing Fluid	Applied Biosystems, Foster City, USA
Attune™ Wash Solution	Applied Biosystems, Foster City, USA

Attune™ 10x Shutdown Solution	Applied Biosystems, Foster City, USA
Attune™ Performance Beads	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Bovines Collagen I 5mg/mL	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Bovines Serum Albumin (BSA) 100x	New England BioLabs Inc., Ipswich
Calcein AM Solution	Sigma Aldrich GmbH, München
Collagenase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DMEM-Medium	Group Ltd, Basel, Schweiz
DNA Ladder 100 bp	Promega GmbH, Mannheim
DNA Ladder 1 kb	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DTT, 0,1M	Invitrogen, Carlsbad, Amerika
Dual Glo® Luciferase Assay Sytem	Promega GmbH, Mannheim

DY-547-labeled siGLO RISC-Free Control siRNA	Dharmacon Inc., Lafayette, USA
Electrolytic Buffer E	Invitrogen, Carlsbad, USA
Endothelial Cell Growth Medium (Ready-to-use)	PromoCell GmbH, Heidelberg
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 100% für Molekularbiologie	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
First Strand Buffer 5x	Invitrogen, Carlsbad, Amerika
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Gene Ruler™ 1kb DNA ladder	Fermentas Life sciences, St. Leon-Rot
Geneticin	Invitrogen GmbH, Darmstadt
human GM-CSF, premium grade	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Glycerol	Sigma Aldrich GmbH, München
Glycin	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Hank'sche Lösung ohne Phenolrot (HBSS)	Apotheke Innenstadt Universität München

Hefeextrakt Servabacter	Serva Electrophoresis, Heidelberg
HEPES	Sigma Aldrich GmbH, München
HISTOPAQUE 1077® (Dichte 1,077 g/mL)	Sigma Aldrich GmbH, München
Isopropanol	Sigma Aldrich GmbH, München
Kanamycinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin
Light Cycler® 480 Probes Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LPS (<i>Escherichia coli</i>)	Sigma Aldrich GmbH, München
LPS (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) (#L4268-10MG; Sigma Aldrich)	Sigma Aldrich GmbH, München
LPS (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) (#L7018-10MG; Sigma Aldrich)	Sigma Aldrich GmbH, München
20x LumiGLO® Reagent and 20x Peroxide	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
MACS BSA Stock Solution	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Magermilchpulver	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

Human MCP-1, research grade	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
human M-CSF, premium grade	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich GmbH, München
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
mirVana microRNA Isolation Kit	Ambion®, Thermo Fisher Scientific, Austin, USA
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat	Roche, Mannheim
Non-essential amino acids (NEAA)	Biochrom AG, Berlin
Neon Transfection 10 µL Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Neon Transfection 100 µL Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
New England CutSmart® Buffer	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
Oligo-dt Primer	Qiagen AG, Hombrechtikon, Schweiz

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pan Monocyte Isolation Kit, human	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
PAXgene™ Blood RNA Kit	Qiagen AG, Hombrechtikon, Schweiz
PAXgene™ Blood miRNA Kit	Qiagen AG, Hombrechtikon, Schweiz
PAXgene™ Blood RNA Blutentnahmeröhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Apotheke Innenstadt Universität München
PCR-Grade Nuklease-freies Wasser	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Pfu Ultra™ II Fusion HS DNA Polymerase	Agilent Technologies, Waldbronn
10x PfuUltra II Reaction Buffer	Agilent Technologies, Waldbronn
Ponceau S	Sigma Aldrich GmbH, München
Pre-miR miRNA Precursor Molecules hsa-miR 125a-5p	Applied Biosystems, Foster City, USA

Pre-miR miRNA Precursor Molecules Negative Control #1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Propidiumiodid	Sigma Aldrich GmbH, München
Protease Inhibitor Cocktail Set 1	Merck KGaA, Darmstadt
psiCHECK™-2 Vektor	Promega GmbH, Mannheim
Pure Yield™ Plasmid Midiprep System	Promega GmbH, Mannheim
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen AG, Hombrechtikon, Schweiz
Qiaprep® Spin Plasmid Miniprep Kit	Qiagen AG, Hombrechtikon, Schweiz
QuickChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
QuikChange® XL10-Gold Ultracompetent Cells	Agilent Technologies, Waldbronn
Random Hexamers	Qiagen AG, Hombrechtikon, Schweiz
Restriktionsenzyme	New England BioLabs Inc., Ipswich, USA
Resuspension Buffer R	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNAqueous RNA Isolation Kit	Ambion®, Thermo Fisher Scientific, Austin, USA

RNAse OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI-1640 Medium	Sigma Aldrich GmbH, München
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
ON-TARGETplus SMART Pool siRNA CCR2, human	GE Dharmacon, Lafayette, USA
ON-TARGETplus SMART Pool siRNA JAM-L, human	GE Dharmacon, Lafayette, USA
ON-TARGETplus SMART Pool siRNA JAM-A, human	GE Dharmacon, Lafayette, USA
ON-TARGET plus non-targeting Pool	GE Dharmacon, Lafayette, USA
Strata Clone™ Blunt PCR Cloning Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
SuperScript® III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA
T4 DNA Ligase	Promega GmbH, Mannheim
T4 DNA Ligase Puffer	Promega GmbH, Mannheim
TaqMan MicroRNA Assay	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan MicroRNA Assay Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Taq Polymerase	Jena Biosciences, Jena

Taq Polymerase 10x Buffer	Jena Biosciences, Jena
Temed	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Tris	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α)	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Human Trustain FcX (Fc Receptor Blocking solution)	Biolegend, San Diego, USA
Trypsin / EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Turbo-DNA-free™ Kit	Ambion, Austin, USA
Tween®-20	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
UPL-Sonde	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Wizard® SV-Gel and PCR Clean-up System	Promega GmbH, Mannheim
Zellyse Puffer (10x)	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA

9.3. Rezepturen (Medien, Puffer und Lösungen)

RPMI-Medium	500 mL RPMI-Medium 10% / 20 % FCS hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin-Streptomycin 1 % L-Glutamin 1 % HEPES
HEK-Medium	500 mL DMEM-Medium 10 % FCS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin-Streptomycin 1% NEAA
LB-Medium	5 g Trypton 5 g Natriumchlorid 2,5 g Hefeextrakt 500 mL Aqua bidest.
LB-Agar	5 g Trypton 5 g Natriumchlorid 2,5 g Hefeextrakt 7,5 g Agar 500 mL Aqua bidest.

Stripping Buffer	15 g Glycin 1 g SDS 10 mL Tween®-20 → in 1 Liter Aqua bidest. gelöst
Lämmli-Probenpuffer (5x)	0,5 M Tris-HCL pH 6,8 45% Glycerol 10% SDS 12,5% β-Mercaptoethanol 0,25% Bromphenolblau
PBS-T	PBS 0,1 % Tween®-20
Puffer A	1:20-Verdünnung: MACS™ BSA Stock Solution autoMACS™ rinsing solution
Sammelgelpuffer	1 M Tris pH 6,8 mit HCl einstellen
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8 mit HCl einstellen
SDS-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1% SDS
Transferpuffer (10x)	250 mM Tris

	1,92 M Glycin
--	---------------

9.4. Gele

Sammelgel 6%	3,38 mL Aqua Bidest. 650 μ L Sammelgelpuffer 52 μ L 10% SDS 1040 μ L 30% Acrylamid 20 μ L 40% APS 4 μ L TEMED
Trenngel 14%	4,875 mL Aqua Bidest. 4,55 mL Trenngelpuffer 182 μ L 10% SDS 8,49 mL 30% Acrylamid 70 μ L 40% APS 5,8 μ L TEMED
Agarose-Gel (2 Gele)	100 mL 1xTBE 1g Agarose Tabletten 7,5 μ L Ethidiumbromid
Chemotaxis-Gel 0,5% Collagen	305 μ L RPMI + 20%FCS äquibriert 2 μ L NaOH 8 μ L 7,5 % NaHCO ₃

	42 μ L bovines Collagen I 5mg/mL 25 μ L Zellsuspension
--	---

9.5. Verbrauchsmaterialien

Plastikwaren	Beckman Coulter, Fullerton, USA Becton Dickinson GmbH, Heidelberg Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf Eppendorf AG, Hamburg Falcon, Heidelberg Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Invitrogen GmbH, Darmstadt Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
--------------	---

<u>Chemotaxisassay:</u> μ -Slide Chemotaxis ibi treat #1,5 polymer coverslip, tissue culture treated, sterilized <u>Adhäsionsassay:</u> μ -Slide I ^{0,6} Luer ibi treat #1,5 polymer coverslip, tissue culture treated, sterilized Channel height: 0,6 mm	ibidi GmbH, Martinsried
--	-------------------------

9.6. Antikörper

Folgende Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

9.6.1. Western Blot

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Blotverfahren
CCR2	rabbit mAb	1 : 750	Cell Signaling 12199 S	Wet Blot, Semi-dry Blot
β -Aktin	rabbit mAb	1 : 40000	Cell Signaling 4970 S	Wet Blot, Semi-dry Blot

Sekundärantikörper	Enzymkopplung	Verdünnung	Hersteller
anti-rabbit	HRP	1 : 2000	Cell Signaling 7074 S

9.6.2. Attune Durchflusszytometer-Analysen

Antikörper	CCR2, anti-human	CD 14	CD 16
Fluorophor	PE	PerCp	Pacific Blue
Hersteller	Biolegend #357205	Biolegend #32563	Biolegend #302024
Absorptionsmax.	565 nm	490 nm	410 nm
Emissionsmax.	573 nm	677 nm	455 nm
Laser, Filter	BL-2, 574/26	BL-3, 640nm/ Longpass	VL-1, 450/40
Isotyp	mouse IgG2a κ PE	mouse IgG1 κ Per Cp	mouse IgG1 κ PB

9.6.3. Oligonukleotide

Alle vorliegenden Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert.

9.6.3.1. Klonierung

Klonierungs- primer	CCR2	JAM-L	JAM-A
Sequenz	<u>for:</u> acgagaagaagagggcataggg <u>rev:</u> accttgccttgcagggc	<u>for:</u> agtccttcacacagcagc <u>rev:</u> caaccattcaccctaaacc	<u>for:</u> gtgtgtggagggtctcttag <u>rev:</u> atgcagaccaccatgatct
Restriktions- schnittstelle for	ctcgag (Xho I)	ctcgag (Xho I)	ctcgag (Xho I)
Restriktions- schnittstelle rev	gtttaaac (Pme I)	gtttaaac (Pme I)	gtttaaac (Pme I)
Größe	840 bp	556 bp	598 b
Annealing- Temperatur	61,1°C	59,6°C	63,7°C

9.6.3.2. Mutagenese

CCR2

Bindestelle 1	<u>for:</u> CAG GTG CCC AGG AAC <u>CTG GGG GCT</u> GTG TGT ACT AAAT A <u>rev:</u> TAT TAG TAC ACA CAG <u>CCC CCA GGT</u> TCC TGG GCA CCT G
----------------------	---

Bindestelle 2	<u>for:</u> ATA TCC AAC ATG TGC TGG GGG AAT AAT CCA GAA AAA <u>rev:</u> TTT TTC TGG ATT ATT CCC CCA GCA CAT GTT GGA TAT
----------------------	--

9.6.3.3. qPCR

Primer	Sequenz for	Sequenz rev	Sonde
TBP	<u>for:</u> GAA CAT CAT GGA TCA GAA CAA CA	<u>rev:</u> ATA GGG ATT CCG GGA GTC AT	#87
B2M	<u>for:</u> TTC TGG CCT GGA GGC TAT C	<u>rev:</u> TCA GGA AAT TTG ACT TTC CAT TC	#42
CCR2	<u>for:</u> TGA GAC AAG CCA CAA GCT GA	<u>rev:</u> TTC TGA TAA ACC GAG AAC GAG AT	#56
JAM-L	<u>for:</u> CAT GTT TTG CCC ACT GAA AC	<u>rev:</u> CAT TCA GGC CCA AGG AAT AA	#18
JAM-A	<u>for:</u> AAG TTG TCC TGT GCC TAC TCG	<u>rev:</u> CGG TCC TCA TAG GAA GCT GT	#7
SDHA	<u>for:</u> GAG GCA GGG TTT AAT ACA GCA	<u>rev:</u> CCA GTT GTC CTC CTC CAT GT	#132
FLT3	<u>for:</u> CTG GGT CTT TAA GCA CAG CTC	<u>rev:</u> TGA CCA TGG AAA CAA CTC CTC	#5
VSIG4	<u>for:</u> CTG GGT CTT TAA GCA CAG CTC	<u>rev:</u> TGA CCA TGG AAA CAA CTC CTC	#69

SEMA4D	<u>for:</u> AAG TGG GTG CGC TAT AAG G	<u>rev:</u> TCA AGG AGC TGG TGT AGT TGG	#1
IL10RA	<u>for:</u> GTC TTG GCT CAG ACG CTC AT	<u>rev:</u> TGC TTC AAA CCA CAC AGA CG	#23
GRK5	<u>for:</u> GGC ACT GTT GGC TAC ATG G	<u>rev:</u> GGC CCT CGA TCA TCT CAT AG	#57
ABCC4	<u>for:</u> GAA GCG CCT GGA ATC TAC AA	<u>rev:</u> AGA GCC CCT GGA GAG AAG AT	#47
SELPLG	<u>for:</u> CTG TCC ACG GAT TCA GCA G	<u>rev:</u> TCG AGT TGT CTG TGC CTC TG	#66

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt dabei meiner Doktormutter Frau Professor Dr. Dr. Simone Kreth für das Überlassen des Themas der vorliegenden Arbeit und ihr in mich gesetztes Vertrauen. Mit Geduld und Verständnis führte sie mich in die wissenschaftliche Arbeit ein und schenkte mir in fachlichen, wie auch in persönlichen Angelegenheiten jederzeit ein offenes Ohr.

Bei Herrn Professor Zwissler möchte ich mich recht herzlich für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in der Klinik für Anaesthesiologie durchzuführen.

Mein Dank gilt auch dem Deutschen Zentrum für Lungenforschung (DZL) für die finanzielle Unterstützung und der CPC Research School für die Förderung in ihrem Graduiertenprogramm.

Bei Herrn PD Dr. Christian Hinske möchte ich mich für die fachkundige bioinformatische Unterstützung und rege Diskussionen bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Max Hübner, der stets an das Projekt geglaubt hat und mir methodisch und thematisch immer zur Seite stand. Seine Anregungen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Frau PD Dr. Kristin Pogoda und Katarzyna Stefanowski möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Etablierung des echtzeitmikroskopischen Migrationsassays und viele konstruktive Diskussionen bedanken.

Herrn Professor Sperandio und Frau Susanne Bierschenk gilt mein Dank für die Einweisung in echtzeitmikroskopische Adhäsionsassays, ihren Ideenreichtum bei der Umsetzung der Versuche und die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Für die unkomplizierte Bereitstellung der Proben von Sepsis-Patienten möchte ich Herrn Professor Michael Bauer der Uniklinik Jena danken.

Mein Dank gilt auch Frau Gaby Gröger, Jessica Rink, Gudrun Prangenberg und Samra Alijagic für ihre großartige Hilfe bei praktischen und theoretischen Fragen. Der kollegiale und freundschaftliche Umgang im Labor hat maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Meine tiefste Verbundenheit und mein größter Dank geht an meine Eltern, Annette und Ludwig Hinske. Was ich heute bin habe ich allein ihnen zu verdanken. Sie haben mich jederzeit liebevoll unterstützt und mir immer auf den rechten Weg geholfen. Ihre Werte

haben mich tief geprägt und beeindruckt und sie sind mir weiterhin ein Vorbild für meinen Lebensweg. Ebenso möchte ich mich bei meinen Brüdern bedanken, die mir stets zur Seite standen.

Auch bei Herrn Roland Tomasi möchte ich mich herzlich bedanken. Er hat mir jederzeit den Rücken gestärkt und mich in schweren Zeiten wieder zum Lachen gebracht hat. Seine unverblünte Art hat mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen gebracht- auch wenn ich dies oftmals nicht hören wollte, weiß ich es jetzt sehr zu schätzen. Ich freue mich auf viele weitere wundervolle Jahre.

Nicht vergessen möchte ich meine Freunde, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, wenn ich es brauchte, aber auch in stressigen Zeiten immer zu mir hielten. Besonders möchte ich mich bei Greta Kiffmeyer bedanken, mit der mich eine jahrelange, tiefe Freundschaft verbindet. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da seid.

11. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

11.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Chemokine und ihre Rezeptoren	S. 13
Abb. 2:	Chemokin- induzierte Migration von Monozyten ins inflammatorische Areal, modifiziert (nach ⁴⁰)	S. 16
Abb. 3:	Die Adhäsionskaskade von Monozyten nach Rekrutierung zum Infektionsherd	S. 18
Abb. 4:	Die Biogenese von microRNAs (nach ⁴⁸)	S. 22
Abb. 5:	Gewinnung primärer humaner Monozyten	S. 27
Abb. 6:	Ligation und Transformation des PCR-Produkts in den Klonierungvektor pSC-B-amp/kan	S. 38
Abb. 7:	Bindestellen der miR-125a in der CCR2 3'UTR und deren Mutationen	S. 43
Abb. 8:	psiCHECK TM -2-Vektor	S. 47
Abb. 9:	Chemotaktische Studien mittels Boyden-Kammer	S. 54
Abb. 10:	Chemotaktische Studien mittels Chemotaxis ^{3D} -Assay	S. 56
Abb. 11:	CCR2-mRNA-Expression in THP-1-Zellen nach Transfektion von prä-miR-125a	S. 63
Abb. 12:	Reinheit isolierter Pan-Monozyten	S. 65

Abb. 13:	Transfektionseffizienz primärer Pan-Monozyten	S. 66
Abb. 14:	CCR2 mRNA- und Proteinexpression nach Transfektion von prä-miR-125a	S. 67
Abb. 15:	Direkte Regulation der CCR2-Expression durch miR-125a	S. 69
Abb. 16:	Durchflusszytometrische Quantifizierung der migrierten Monozyten	S. 70
Abb. 17:	Echtzeitmikroskopische Untersuchung der gerichteten Migration transfizierter Monozyten	S. 72/73
Abb. 18:	Heatmap der differenziell regulierten Gene in Monozyten nach Transfektion mit prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC	S. 75
Abb. 19:	Evaluation der Zielgene der Expressionsanalyse mittels Affymetrix GeneChip® Prime View™ Human Gene Expression Assay	S. 76
Abb. 20:	Durchflusszytometrische Bestimmung der Proteinexpression der miR-125a Zielgene JAM-A und JAM-L nach Transfektion der prä-miR-125a bzw. prä-miR-NC	S. 78
Abb. 21:	Direkte Bindung der miR-125a an die JAM-A und JAM-L 3'UTR	S. 80
Abb. 22:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme Calcein-gefärbter adhärenter Monozyten nach Transfektion mit prä-miR-125a und prä-miR-NC mit anschließendem Calceinassay	S. 82
Abb. 23:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme Calcein-gefärbter adhärenter Monozyten nach Knockdown mittels siRNA gegen CCR2, JAM-L und JAM-A mit anschließendem Calceinassay	S. 84

Abb. 24:	miR-125a- bzw. CCR2-, JAM-L- und JAM-A-mRNA-Expression in humanen Monozyten nach Stimulation mit LPS (<i>E.coli</i>)	S.86
Abb. 25:	CCR2-mRNA-Expression und miR-125a-Expression in humanen Monozyten nach Stimulation mit CCL2	S. 87
Abb. 26:	Echtzeitmikroskopische Untersuchung der gerichteten Migration von Monozyten nach Stimulation mit LPS	S. 88/89
Abb. 27:	LPS reguliert je nach bakteriellem Serotyp die CCR2 (mRNA und Protein)- und miR-125a-Expression in humanen Monozyten	S. 92
Abb. 28:	Ausdifferenzierung von primären humanen Monozyten zu Makrophagen reguliert die CCR2-mRNA- und miR-125a-Expression	S. 94
Abb. 29:	Ausdifferenzierung von primären humanen Monozyten zu Makrophagen mittels M-CSF führt zur Reduktion der JAM-L, aber Induktion der JAM-A-mRNA-Expression	S. 95
Abb. 30:	Expression von miR-125a und der Zielgene CCR2, JAM-L und JAM-A in Vollblut-RNA (PAXGene) von Sepsis-Patienten	S. 97

11.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete Zellen und Zelllinien	S. 25
Tab. 2:	Versuchsbedingungen transfizierter primärer humaner Monozyten	S. 45

Tab. 3:	<i>In silico</i> -Identifizierung von zwei Bindestellen in der CCR2 3'UTR (TargetScan)	S. 62
Tab. 4:	Durchschnittliches Alter der Probanden in Jahren (Mittelwert \pm SEM)	S. 96
Tab. 5:	Zielgene der miR-125a und ihre beschriebenen Aufgaben	S. 104

12. Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3'Untranslatierte Region
5'UTR	5'Untranslatierte Region
ABCC4	ATP binding Cassette Subfamily C Member 4
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome (Akutes Atemnotsyndrom)
B2M	Beta-2 microglobulin
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
bzw.	beziehungsweise
CCL	Chemokin, CC-Familie
CCR	Chemokinrezeptor, CC-Familie
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary DNA (= komplementäre DNA)
COM	Center of Mass

Cp-Wert	Crossing Point
CXCL	Chemokin, CXC-Familie
CXCR	Chemokinrezeptor, CXC-Familie
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8
DNA	Desoxyribonucleic acid (=Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds-RNA	doppelsträngige RNA
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanate, a chemical compound
FLT3	fms-related Tyrosine Kinase 3
Fluc	Firefly Luciferase
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (= Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)
GRK5	G protein-coupled receptor kinase 5

	(= G Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase 5)
HEK293	Human Embryonic Kidney (= menschliche embryonale Nierenzellen)
HIF-1a	Hypoxia-inducible factor-1 α
HUVEC	Humane Umbilikalvenenendothelzellen
ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule (= Interzelluläre Zelladhäsionsmoleküle)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-10-R	Interleukin-10 Rezeptor
IL-10-RA	Interleukin-10 Rezeptor, α subunit
JAM	Junktionales Adhäsionsmolekül
kDa	Kilodalton
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid

Mac-1	Macrophage-1 Antigen
MCS	Multiple Cloning Site
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor, (= Monozytenkolonien-stimulierender Faktor)
miR	microRNA
MPS	Mononukleäres Phagozytotische System
mRNA	messenger RNA
NEAA	Non-essential amino acids
n.s.	nicht signifikant
NFkB	Nuclear factor- κ B
NLR	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor, NOD-like receptor
ORF	Open Reading Frame
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PCR	Polymerase Chain Reaction (= Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin Chlorophyll Protein
PLCB2	Phospholipase C β 2
PMN	polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PRR	Pattern-recognition receptor
PXN	Paxillin
qPCR	Quantitative Real-Time Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
Ran-GTP	Ras-related nuclear protein Guanosintriphosphat
RES	Retikuloendotheliales Systems
RHS	Retikulohistiozytäres System
RISC	RNA-induced Silencing Complex

Rluc	Renilla Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (= Natriumlaurylsulfat)
SELPLG	Selectin P Ligand
SEM	Standard error of the mean (= Standardfehler)
SEMA4D	Semaphorin 4D
sog.	sogenannt
TBP	TATA-binding protein
TEM	transendotheliale Migration
TGF	Transforming Growth Factor
THP-1	humane monozytäre Zelllinie

TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
U	Unit (Enzymaktivität)
UPL	Universal ProbeLibrary
UV	ultraviolett
VSIG4	V-Set and Immunoglobulin Domain containing 4
z. B.	zum Beispiel

